

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Medicina

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología



Máster en Investigación Biomédica

HOMEOSTASIS DE Ca^{2+} Y EXOCITOSIS EN LAS CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS CAROTÍDEAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER PRESENTADO POR

Inmaculada Docio Cuadrado

TUTORAS

Dra. Asunción Rocher Martín

Dra. Rosalba Inés Fonteriz García

Valladolid, 2013

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Marco en el que se desarrolla este trabajo.....	1
1.2. Homeostasis de calcio celular.....	1
1.3. Intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX): estructura y función.....	4
1.4. El calcio como mensajero fundamental de la exocitosis.....	5
1.5. El cuerpo carotídeo: células quimiorreceptoras (tipo I).....	6
1.6. Dinámica de calcio en las células quimiorreceptoras.....	8
1.6.1. Mecanismos de la membrana plasmática.....	8
1.6.2. Depósitos intracelulares: Retículo endoplasmático y mitocondria.....	9
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1. Animales de experimentación y procedimiento quirúrgico.....	11
3.2. Cultivo de células quimiorreceptoras de CC.....	11
3.3. Inmunocitoquímica.....	12
3.4. Medida de fluorescencia en células quimiorreceptoras de CC.....	13
3.4.1. Medida de concentración libre de calcio en el citosol con Fura-2-AM.....	13
3.4.2. Equipo de imagen de fluorescencia.....	13
3.4.3. Determinación experimental de medidas de fluorescencia.....	14
3.5. Medida de la actividad de las CQ: liberación de catecolaminas por el CC.....	14
3.5.1. Marcaje de los depósitos de CA de células quimiorreceptoras.....	14
3.5.2. Liberación de ³ H-CA.....	15
3.5.3. Análisis de ³ H-CA.....	15
3.6. Western Blot.....	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Puesta a punto de medida de calcio en CQ: respuestas a estímulos de K⁺, hipoxia e hipercapnia.....	17
4.2. Presencia del intercambiador Na⁺/Ca⁺ (NCX) en CQ de CC.....	18
4.3. Papel funcional del intercambiador Na⁺/Ca⁺ (NCX) en CQ de CC.....	20
4.4. Expresión de NCX y otras proteínas relacionadas con la homeostasis del calcio en CC de rata.....	22
4.4.1. Análisis de la expresión mediante Western Blot.....	22
4.4.2. Localización de NCX y otras proteínas mediante inmunocitoquímica.....	23
4.5. Posible papel mitocondrial en la homeostasis de Ca²⁺ de las CQ.....	25
5. DISCUSIÓN.....	26
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30

ABREVIATURAS

ATP	adenosín trifosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CA	catecolaminas
CC	cuerpo carotídeo
CQ	células quimiorreceptoras
DA	dopamina
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
FCCP	carbonilciadina-p-trifluorometoxifenil hidrazona
GCS	ganglio cervical superior
GFAP	proteína fibrilar ácida glial
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico
HRP	peroxidasa de rábano
MCU	uniportador de calcio mitocondrial
NCKX	intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$
NCX	intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NSC	nervio del seno carotídeo
NT	neurotransmisores
PBS	buffer fosfato salino
PCO₂	presión parcial de dióxido de carbono
PMCA	ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática
PO₂	presión parcial de oxígeno
RE	retículo endoplásmico
SEM	error standard de la media
SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico
SNC	sistema nervioso central
SOC	canal de Ca^{2+} operado por depósito
TH	tirosina hidroxilasa
VOCC	canal de Ca^{2+} operado por voltaje

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO EN EL QUE SE DESARROLLA ESTE TRABAJO

Este trabajo se enmarca dentro del área “**Señalización mediada por calcio y exocitosis de neurotransmisores**”, versa sobre el estudio de mecanismos básicos en la homeostasis de calcio celular y se ha desarrollado bajo la supervisión de las Dras. Fonteriz y Rocher, en el departamento de bioquímica y biología molecular y fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, en el contexto de una colaboración establecida con anterioridad. En concreto, se ha centrado en el análisis de señales de calcio (Ca^{2+}) y su correlación con la exocitosis de neurotransmisores que las células sensoras del cuerpo carotídeo (CC) (células tipo I o quimiorreceptoras, CQ), implicadas en la detección de la presión parcial de oxígeno en sangre, utilizan para poner en marcha reflejos respiratorios que tienden a minimizar la intensidad y los daños deletéreos de la hipoxia. Los resultados obtenidos en algunos experimentos son preliminares y estamos evaluando la continuación del estudio.

1.2. HOMEOSTASIS DE CALCIO CELULAR

El aumento de Ca^{2+} es una señal intracelular muy versátil y potente que puede originar gran cantidad de respuestas por parte de las células, tan diversas como la exocitosis de un neurotransmisor en el sistema nervioso, la contracción muscular o la activación de la transcripción génica. La señal intracelular de Ca^{2+} por estar implicada en gran cantidad de procesos tan distintos entre sí, ha de estar también finamente regulada con el fin de no provocar efectos indeseados. Para ello, la célula dispone de una compleja maquinaria para mantener la homeostasis del Ca^{2+} en niveles fisiológicos. Por tanto, la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) depende en cada momento de la cantidad de Ca^{2+} que entra en la célula, principalmente desde el exterior celular, y de la cantidad de Ca^{2+} que es retirado por los mecanismos de extrusión de Ca^{2+} de que dispone la célula, bien a los depósitos intracelulares o al exterior celular (Berridge *et al.*, 2003).

En condiciones normales, los niveles intracelulares de Ca^{2+} son mantenidos en un rango de concentración de aproximadamente $0,1 \mu\text{M}$, es decir, 10.000 veces inferior a la del mismo ión en el compartimento extracelular. Existen concentraciones similares a las del medio extracelular en los distintos depósitos intracelulares de Ca^{2+} , fundamentalmente el retículo endoplásmico (RE). Por ello, el mantenimiento de estos gradientes conlleva un enorme gasto energético para la célula, que aún así utiliza este ión para multitud de señalizaciones.

Para que cese la señal, una vez que el calcio ha aumentado por la activación celular, resulta necesario que se restablezcan los niveles normales, por lo que el calcio debe salir al medio extracelular en la misma concentración que entró. Pero esto no es fácil, ya que al contrario de su entrada por canales, la salida del calcio es en contra de gradiente de concentración, con gasto energético. También hay bombas e intercambiadores de calcio en la mitocondria y el retículo, donde tenemos que considerar que la concentración de calcio es mayor, ya que son depósitos de calcio, por lo que en este caso las bombas e intercambiadores de calcio deben de facilitar su entrada en la mitocondria y el retículo, mientras que la salida se produce por canales a favor de gradiente.

Transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática

Los principales mecanismos implicados en el transporte de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática son: canales de Ca^{2+} , bomba ATPasa de Ca^{2+} e intercambiadores: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$.

Los **canales de Ca^{2+}** son proteínas integrales de membrana, ubicuas, que forman poros a través de los cuales se produce el flujo selectivo de calcio a favor de gradiente electroquímico. Se pueden clasificar en función de su localización subcelular o según su mecanismo de activación, agrupándose según este último en 2 familias:

- Canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCs; del inglés, *Voltage Operated Channels*), dominantes en células excitables. Estos canales se abren bruscamente en respuesta a una despolarización suficiente de la membrana plasmática, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular al citosol. Esta entrada suele ser muy rápida debido al enorme gradiente electroquímico para este ión. La repolarización de la membrana produce el cierre de estos canales. Además, todos los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOCCs) presentan una

inactivación dependiente del tiempo. Desde un punto de vista funcional, dependiendo del rango de voltaje necesario para lograr su apertura, existen dos grandes tipos de VOCCs: los canales de bajo umbral de activación (LVA), también denominados tipo T (transitorios) y los de alto umbral de activación (HVA), con varios subtipos: canales L (por su larga duración), N (por su origen neuronal), P (llamados así por su descripción original en células de Purkinje), Q y R (por su carácter residual) (Catterall, 2000).

- Canales de Ca^{2+} no operados por voltaje pero regulados por receptor (ROCs; del inglés, *Receptor Operated Channels*), segundos mensajeros (SMOCs; del inglés, *Second Messenger Operated Channels*) o depósitos (SOCs; del inglés, *Store Operated Channels*) en general predominantes en células no excitables aunque también presentes en las células excitables (Villalobos y García-Sancho, 1995). Los SOCs son canales de Ca^{2+} que forman una vía de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, activada tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . Este mecanismo denominado entrada capacitativa de Ca^{2+} o entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (ECC o SOCE) (Putney, 1986), es un mecanismo ubicuo de entrada de Ca^{2+} . Además, guarda una importante relación funcional con orgánulos subcelulares, que participan en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, como son el RE y la mitocondria. Su búsqueda condujo al descubrimiento de una nueva superfamilia de canales iónicos, los TRP (del inglés; *Transient Receptor Potencial*), algunos de los cuales son considerados SOCs (Salido *et al.*, 2011).

La **PMCA** (del inglés; *Plasma Membrane Calcium ATPase*) es la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática presente en todas las células eucariotas. Su afinidad por el Ca^{2+} es muy alta ($K_{50}=0,1 \mu\text{M}$), aunque su capacidad es baja (Saris y Carafoli, 2005). Transporta un Ca^{2+} por cada molécula de ATP que hidroliza y requiere la presencia de Mg^{2+} en el lado citosólico. Este catión no se transporta y puede resultar inhibitorio para la PMCA si su concentración es elevada, al competir con el Ca^{2+} por el sitio de transporte.

El **intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$** (NCX), situado en la membrana plasmática, es un transportador electrogénico, de baja afinidad y alta capacidad (Saris y Carafoli, 2005), que en condiciones normales intercambia un Ca^{2+} citosólico por 3 Na^+ extracelulares. Normalmente la energía para este flujo proviene del gradiente electroquímico del Na^+ , que lo impulsa hacia el interior de la célula. No obstante, el sistema es reversible, y la dirección de los flujos puede variar dependiendo de la magnitud y polaridad del potencial de membrana y de los gradientes iónicos. En condiciones de reposo, el flujo neto de Ca^{2+} es prácticamente nulo.

El **intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$** (NCKX) es una proteína de la membrana plasmática expresada en la retina y en el cerebro. Como el NCX es de baja afinidad con alta capacidad de transporte y también es electrogénico: intercambia un Ca^{2+} y un K^+ del interior celular por 4 iones Na^+ extracelulares (Altimimi y Schnetkamp, 2007).

Transporte de Ca^{2+} a través del retículo endoplasmático

Los depósitos intracelulares de Ca^{2+} no son un almacén pasivo de Ca^{2+} , participan directamente en los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que suceden durante la activación celular. Incluso en condiciones de reposo, existe un equilibrio dinámico entre el continuo rellenado por bombeo, y la fuga permanente a través de los canales de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . El más estudiado por su implicación en la señalización del Ca^{2+} es el RE, cuya concentración de Ca^{2+} en condiciones normales es similar a la del medio extracelular. El núcleo y las mitocondrias también almacenan Ca^{2+} pero sólo de un modo transitorio, ya que en condiciones basales presentan una concentración de Ca^{2+} libre similar a la del citosol (Montero *et al.*, 2000; Chamero *et al.*, 2002).

Los principales **canales de Ca^{2+} del RE** pertenecen a dos familias diferentes desde el punto de vista molecular en función de su sensibilidad a un segundo mensajero fisiológico: receptores de IP_3 (IP_3R ; del inglés, *Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor*) o receptores del alcaloide rianodina (RyR; del inglés, *Ryanodine Receptor*). Ambas familias están altamente conservadas, presentan homología parcial de secuencia y organización estructural, así como cierta similitud fisiológica (Berridge, 1993).

Son proteínas de membrana encargadas de la liberación de Ca^{2+} desde el lumen del RE al citosol tras la unión del ligando correspondiente al receptor.

Por otro lado, la **bomba de Ca^{2+}** tipo SERCA (del inglés, *Sarcoplasmic and Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) es un sistema de transporte activo primario situado en el RE que bombea Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del RE con muy alta afinidad ($K_{50} = 0,1 \mu\text{M}$).

Transporte de Ca^{2+} a través de la mitocondria

El principal mecanismo conocido responsable de la entrada de Ca^{2+} en la mitocondria es el uniportador de calcio mitocondrial (MCU; del inglés, *Mitochondrial Calcium Uniporter*) mientras que el Ca^{2+} sale de la mitocondria a través de mecanismos que actúan como intercambiadores dependientes o no de Na^+ y que son, principalmente, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (NCXm) y el intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (Letm1).

El **uniportador de calcio mitocondrial** consiste en una proteína de 40 kDa localizada en la membrana mitocondrial interna (MMI). Estudios electrofisiológicos han mostrado que es un canal selectivo para Ca^{2+} que funciona conduciendo corriente hacia el interior de la matriz mitocondrial a favor del gradiente eléctrico mantenido a través de la membrana mitocondrial interna por las bombas de protones de la cadena respiratoria (Kirichok *et al.*, 2004).

El **intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial** es el principal mecanismo de salida de Ca^{2+} de la mitocondria (Montero *et al.*, 2001). Pertenece a la superfamilia de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), sin embargo, presenta diferencias en cuanto a su filogenética y funcionalidad. El mNCX presenta dos isoformas de 50 y 70 kDa que pueden llegar a formar dímeros de hasta 100 kDa y se localiza en la IMM. El mNCX responde frente a cambios drásticos en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ de manera dependiente de Na^+ y de forma electrogénica, ya que sigue una estequiometría de $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$.

En cuanto al **intercambiador de $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$** se ha propuesto que podría llevar a cabo la entrada electrogénica de 1Ca^{2+} en intercambio con la salida de 1H^+ , cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ es baja. Sin embargo, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ es elevada o el pH citosólico muy bajo, el intercambiador realizaría el proceso inverso, sacando Ca^{2+} de la mitocondria (Malli, 2010).

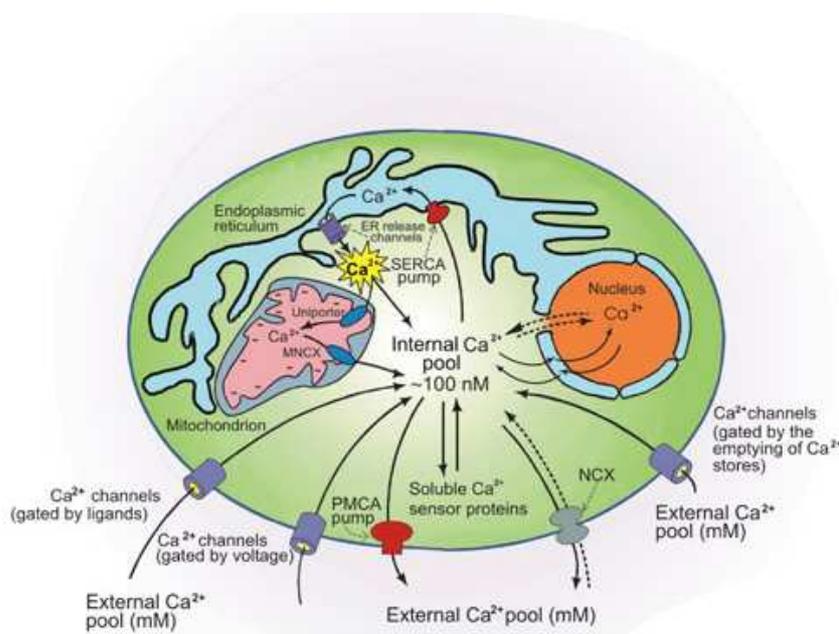


Figura 1. Homeostasis del Ca^{2+} intracelular. En la membrana plasmática, los canales de Ca^{2+} permiten la entrada de Ca^{2+} del exterior celular ($1\text{mM } \text{Ca}^{2+}$) al interior celular ($100\text{nM } \text{Ca}^{2+}$) a favor de gradiente electroquímico. La PMCA y el NCX permiten la salida de Ca^{2+} en contra de gradiente. El Ca^{2+} citosólico puede ser captado por el RE, a través de la SERCA, donde alcanza una concentración muy elevada (1mM). El exceso de Ca^{2+} también puede ser captado por la mitocondria a favor de gradiente electroquímico a través del MCU. El Ca^{2+} almacenado en los depósitos puede ser liberado al citosol a través de canales de Ca^{2+} de endomembranas activados por IP_3 (IP_3R) o a través del receptor de rianodina (RyR) (Carafoli, 2003).

1.3. INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX): ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

En cuanto al movimiento de calcio mediado por proteínas transportadoras de membrana, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) es un mecanismo de gran importancia por cuanto ha sido descrito en un gran número de tejidos y células, como epitelios, eritrocitos, células endocrinas y células excitables, especialmente neuronas, músculo liso y cardiaco. El NCX, como la PMCA, se encuentra en la membrana plasmática y contribuye a la extrusión de Ca^{2+} cuando se eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Aunque utiliza la energía almacenada en el gradiente electroquímico de Na^+ para retirar Ca^{2+} de la célula, no obstante, el movimiento del Ca^{2+} mediado por el NCX puede cambiar de dirección durante el ciclo celular, con las variaciones del potencial de membrana y/o cuando se altera la concentración citosólica de Na^+ o de Ca^{2+} (Annunziato *et al.*, 2004).

Hasta el momento, se han clonado 3 isoformas: NCX1 (expresada en múltiples tejidos es la única presente en el corazón), la NCX2 y la NCX3 (en las dos limitada su expresión a cerebro y músculo esquelético). Los modelos iniciales de la isoforma NCX1 (de 110kDa) del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sugerían que esta proteína poseía 12 segmentos transmembrana. Posteriormente, se encontró que el segmento hidrofóbico inicial de 32 aminoácidos es un péptido señal que se separa de la proteína durante su procesamiento inicial en el retículo endoplasmático. Actualmente se cree que el intercambiador posee solamente 9 segmentos transmembrana. La región N-terminal de esta proteína está glicosilada en la posición 9, y por lo tanto, es extracelular (Iwamoto, 2007). Se ha descrito que la glicosilación y la hidrólisis del péptido señal no influyen significativamente en la función de este transportador (Hryshko *et al.*, 1995). El NCX posee un dominio hidrofóbico N-terminal con 5 segmentos transmembrana y un dominio C-terminal formado por 4 segmentos (Fig. 2A).

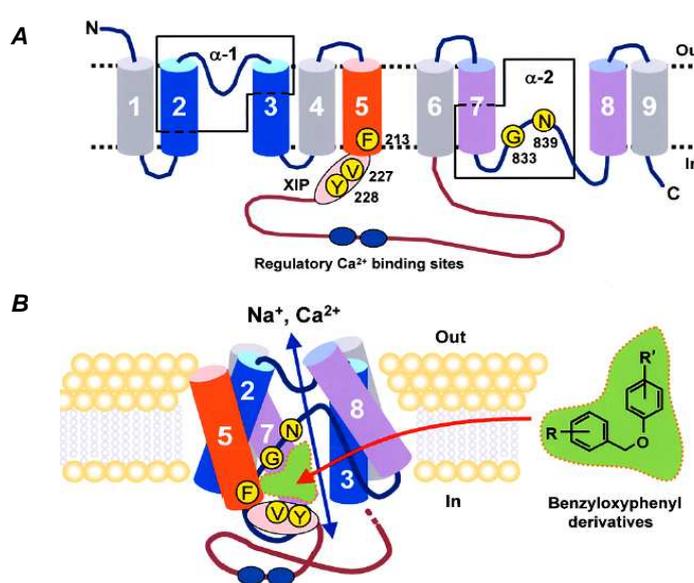


Figura 2. Modelo actual de la estructura del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. **A.** La proteína posee 9 segmentos que atraviesan la membrana plasmática. Se muestra en el lazo intracelular la región reconocida por el péptido inhibitorio XIP, el sitio de regulación y unión a Ca^{2+} . **B.** Ilustración que representa los dominios estructurales responsables de la unión a derivados del benziloxifenil: KB-R7943, SEA0400 y SN-6 (Iwamoto, 2004).

Como ya he comentado, cuando el intercambiador opera en el modo reverso promueve la entrada de Ca^{2+} , como ocurre durante el inicio del potencial de acción de los cardiomiocitos, facilitado por el alto grado de despolarización de la membrana en esta etapa junto con el incremento temporal de la concentración de Na^+ citoplásmico, contribuyendo a la rápida entrada de Ca^{2+} necesaria para el acoplamiento excitación-contracción. A medida que la concentración de Na^+ disminuye en el interior de la célula, hacia la segunda mitad de la meseta del potencial de acción, el intercambiador revierte su acción hacia la forma directa, sacando Ca^{2+} (Lipp *et al.*, 1994). Por tanto, contribuye a mantener la despolarización por más tiempo y a alargar la fase de meseta, mientras saca Ca^{2+} , facilitando el proceso de relajación, aunque es mayor la contribución de las ATPasas dependientes de calcio, tanto de la membrana citoplasmática como del RE.

En resumen, una de las características más importantes del NCX, desde el punto de vista funcional, es su capacidad de actuar en ambas direcciones (**Fig. 3**). La dirección final a la cual se moverá el Ca^{2+} está determinada principalmente por el gradiente de Na^+ , aunque también depende, en menor medida, del gradiente de K^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Watanabe *et al.*, 2006). Experimentalmente se puede revertir eliminando el Na^+ del medio extracelular, lo que promueve entrada de calcio medible en aquellas células que tienen un intercambiador muy activo. Por supuesto, cualquier agonista o antagonista de los canales de calcio, afectará a la concentración de calcio y, por tanto, al funcionamiento del NCX. También es posible bloquear el NCX_{REV} mediante compuestos que preferentemente bloquean la entrada de calcio por el intercambiador como el KB-R7943 o SEA0400.

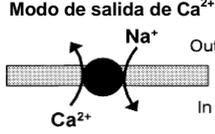
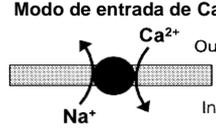
Modo de transporte	 <p>Modo de salida de Ca^{2+}</p>	 <p>Modo de entrada de Ca^{2+}</p>
Función fisiológica	Bombeo de Ca^{2+} después de su movilización	Entrada de Ca^{2+} en condiciones especiales (incrementos de $[\text{Na}^+]_i$ y despolarización)
Acción de inhibidores	Incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$	Inhibe la sobrecarga de Ca^{2+} disminuyendo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$
Eficacia esperada	Acción cardiotónica Acción hipertensa	Acción anti-isquemia (Contra la lesión por isquemia/reperfusión) Desintoxicación de digital Acción anti-hipertensión

Figura 3. Implicaciones fisiológicas y farmacológicas del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Modificado de Iwamoto, 2004).

El KB-R7943 se desarrolló en los años 90 como un inhibidor supuestamente selectivo del NCX_{REV} . La molécula tiene selectividad dependiendo de la isoforma e inhibe al NCX3 aproximadamente tres veces más que el NCX1 o el NCX2 (Iwamoto, 2004). Posteriormente se ha descrito que este compuesto es inespecífico, ya que además de inhibir al NCX_{REV} también se une al transportador de norepinefrina, bloquea al receptor nicotínico de acetilcolina (Pintado *et al.*, 2000), a los canales de Ca^{2+} (SOC y VDC), K^+ y Na^+ (Matsuda *et al.*, 2001) y al MCU (Santo-Domingo, 2007). Otros inhibidores más recientes del NCX_{REV} son el SEA0400 y el SN-6. El SEA0400 ha sido probado en neuronas y miocitos cardiacos, tiene una IC_{50} de 30-40 nM y, a diferencia del KB-R7943 (IC_{50} de 5-10 μM), parece no tener efectos sobre canales o receptores cuando se usa a concentraciones nM (Tanaka *et al.*, 2002). El SN-6, un inhibidor más selectivo con una IC_{50} de 2.9 μM , no bloquea a otros transportadores de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ó H^+ y en la actualidad está siendo ampliamente utilizado (Kita *et al.*, 2007).

1.4. EL CALCIO COMO MENSAJERO FUNDAMENTAL DE LA EXOCITOSIS

La exocitosis consiste en la fusión de la membrana de las vesículas secretoras con la membrana plasmática de la célula con la finalidad de liberar al espacio extracelular las sustancias almacenadas en su interior. Se trata de un proceso celular universal y es la manera más común de secretar mensajeros químicos y renovar componentes celulares. Además, es el procedimiento mediante el cual las células neuroendocrinas y neuronales liberan los neurotransmisores de forma cuántica.

Existen dos tipos de exocitosis en las células eucariotas: la constitutiva y la regulada (Kelly, 1985; Burgess y Kelly, 1987). Durante la exocitosis constitutiva, que tiene lugar en todos los tipos celulares, las sustancias químicas son secretadas constantemente y dicha secreción no está regulada por señales intracelulares. La exocitosis como mecanismo de secreción regulada es un proceso dependiente de calcio, una especialización de la ruta de secreción constitutiva que tiene lugar en tipos celulares específicos como las neuronas y los sistemas endocrinos y neuroendocrinos (Zucker, 1996).

La combinación de técnicas electrofisiológicas y de fluorescencia han permitido relacionar los fenómenos de membrana con la concentración del calcio intracelular y la exocitosis, dando soporte a la definición clásica del término acoplamiento "excitación-secreción" (Douglas, 1968), donde un aumento en la concentración del calcio intracelular es el nexo entre la excitación y la secreción.

En las neuronas, la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que ocurre tras la despolarización celular, produce un aumento en la concentración del calcio intracelular en cuestión de microsegundos. En estas células, los canales de calcio forman complejos proteicos multiméricos donde las vesículas sinápticas se encuentran a pocos nanómetros de distancia de la membrana plasmática y la exocitosis tiene lugar en cuestión de milisegundos.

1.5. EL CUERPO CAROTÍDEO: CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS (TIPO I)

En los animales superiores los quimiorreceptores arteriales, es decir, los cuerpos aórticos y en particular los cuerpos carotídeos (CC), son los encargados de poner en marcha los mecanismos reguladores que, al actuar sobre los aparatos respiratorio y circulatorio, tienden a contrarrestar los efectos de la hipoxia. Las células quimiorreceptoras (CQ) del CC detectan la PO_2 sanguínea, y las células epitelioides de los cuerpos aórticos, el contenido de O_2 de la sangre. En situaciones en las que disminuye la PO_2 o el contenido de O_2 en sangre, los CC y los cuerpos aórticos generan respuestas reflejas, con el aparato respiratorio y circulatorio como principales efectores, para aumentar el bombeo de aire a los pulmones y de sangre a los tejidos, y así tratar de restablecer los parámetros a la normalidad. Asimismo el CC, en cooperación con los quimiorreceptores centrales, realiza una función homeostática en relación al pH del medio interno. El CC es capaz de detectar variaciones sanguíneas en la PCO_2 y la concentración plasmática de H^+ y, cuando estos parámetros aumentan, generan reflejos respiratorios y circulatorios eliminando el exceso de H^+ en forma de CO_2 .

Como se muestra en la **figura 4**, desde el punto de vista estructural, el cuerpo carotídeo es un pequeño órgano par situado en las inmediaciones de la bifurcación de la arteria carótida común. Cada CC recibe irrigación por la arteria glómica que emerge desde la carótida externa, formando una extensa red de capilares que le permite mantener un elevado flujo sanguíneo (González *et al.*, 1994). El CC está organizado en islotes celulares separados por tejido conectivo con una densa red de capilares. El conjunto formado por un islote celular y la red capilar circundante recibe el nombre de glomérulo o glomoide. Dentro de estos islotes encontramos dos tipos de células:

- a) Las células **glómicas, quimiorreceptores o de tipo I (CQ)**: son las más abundantes e importantes desde el punto de vista funcional. Su forma es redondeada u ovoidea, tienden a ocupar el centro de los islotes y poseen un citoplasma rico en mitocondrias y vesículas de núcleo denso. Son células cromafines que derivan embriológicamente de la cresta neural (Pearse *et al.*, 1973) y contienen catecolaminas (CA) y péptidos opioides. También se observan vesículas pequeñas de núcleo claro, que según algunos autores podrían contener acetilcolina (Verna, 1997).
- b) Las células **sustentaculares, de soporte o de tipo II**: son células aplanadas, sin especializaciones citoplasmáticas, que se sitúan en la periferia de los islotes rodeando de forma incompleta a las CQ (Verna, 1997). Se consideran células de soporte de naturaleza neuroglial.

Las CQ están inervadas por fibras nerviosas sensoriales que forman el nervio del seno carotídeo (NSC), cuyos somas se encuentran en el ganglio petroso. Estas fibras sensoriales son las que van a llevar la información al tronco del encéfalo y constituyen el brazo aferente de los reflejos cardiorrespiratorios encaminados a optimizar la oxigenación de la sangre a nivel pulmonar y la perfusión tisular. En consecuencia, el CC es un órgano sensorial secundario ya que sus células especializadas detectan y transducen los estímulos, mientras que una segunda célula (una neurona) transmite el mensaje (Verna, 1997).

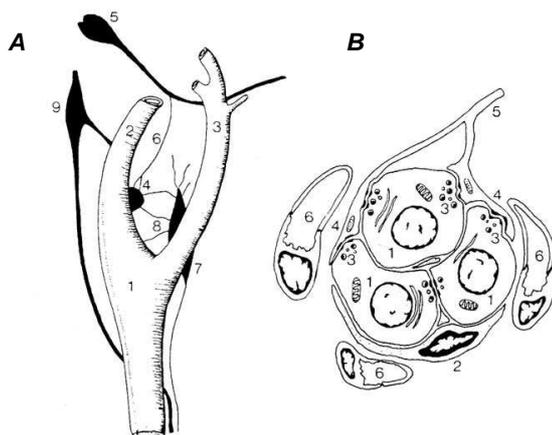


Figura 4. Esquema de la bifurcación carotídea y de un islote celular del cuerpo carotídeo. **A.** 1. Carótida común; 2 y 3. Carótidas interna y externa; 4. Cuerpo carotídeo; 5 y 6. Ganglio petroso y nervio del seno carotídeo; 7 y 8. Ganglio cervical superior y nervios ganglioglomerulares; 9. Ganglio nodoso. **B.** 1. CQ; 2. Célula sustentacular; 3. Vesículas sinápticas en las CQ; 4 y 5. Terminaciones y fibra sensorial; 6. Capilares sanguíneos. (González *et al.*, 1994).

El CC recibe además inervación parasimpática de neuronas presentes en la superficie del CC y existen fibras simpáticas que inervan las arteriolas intraglomerulares controlando el flujo de sangre que llega al CC de forma opuesta a como lo hacen las fibras parasimpáticos (González *et al.*, 1994).

Esta organización estructural del CC permite el acoplamiento funcional de todos sus elementos. Los capilares cercanos a las CQ minimizan el espacio de difusión entre la sangre y las células para que éstas puedan detectar de forma rápida variaciones en la presión arterial de O_2 , CO_2 y pH (**Detección**). Cuando las células glómicas detectan una disminución en la PO_2 sanguínea se produce una inhibición de canales K^+ de la membrana que lleva a la despolarización de la célula. Esta despolarización induce la apertura de VOCCs con la consiguiente entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. El incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} induce la secreción de los neurotransmisores contenidos en las vesículas al espacio sináptico (**Transducción**) y la activación de fibras nerviosas aferentes que transmiten la información al SNC (**Transmisión**). De este modo, la información sobre el contenido de oxígeno en sangre es rápidamente transmitida al centro respiratorio del troncoencéfalo, produciéndose cambios en la respuesta de los aparatos respiratorio y cardiovascular (**Efectores**), encaminados a corregir la alteración detectada por el CC.

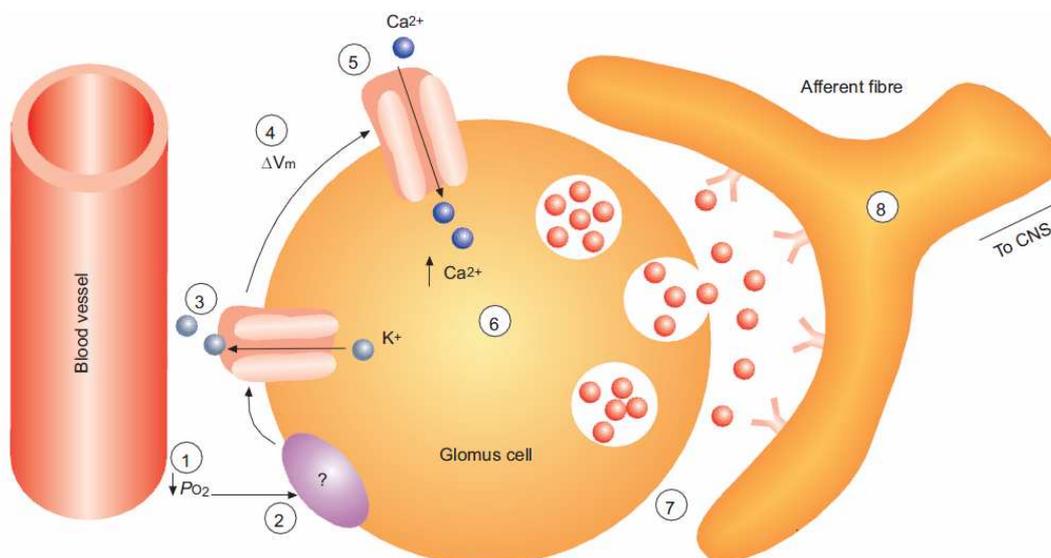


Figura 5. Modelo de membrana en la detección de oxígeno por células glómicas. Pasos en la transducción quimiosensorial: 1. Disminución de la presión parcial de oxígeno (PO_2). 2. Sensor de O_2 . 3. Cierre de los canales de K^+ . 4. Despolarización celular. 5. Apertura de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes. 6. Aumento de la concentración de calcio intracelular, $[Ca^{2+}]$. 7. Liberación de neurotransmisores. 8. Activación de las fibras aferentes, que envía la información al sistema nervioso central (SNC). La naturaleza del sensor de O_2 y los mecanismos por los que cambios en la presión de O_2 regulan la actividad de los canales de K^+ son todavía desconocidas (signo de interrogación). ΔV_m : cambios en el voltaje de la membrana (López-Barneo, 2008).

1.6. DINÁMICA DE CALCIO EN LAS CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS DE CC

Como ya he comentado previamente, las células glómicas del CC son células excitables y sensibles a la PO_2 y a la PCO_2/pH arterial. En situación de hipoxia y acidosis se activan, incrementando la velocidad de secreción de neurotransmisores. Para que suceda este acoplamiento excitación-secreción es necesario un aumento del calcio intracelular, a su vez dependiente del Ca^{2+} del medio extracelular, excepto para el caso de la adenosina (Obeso *et al.*, 1992; González *et al.*, 1994). Se sabe además que la entrada de calcio se produce en todos los casos a través de VOCCs activados por la despolarización de la membrana tras el cierre de diferentes tipos de canales de K^+ . El consiguiente aumento de calcio intracelular en dichas células dispara la exocitosis, co-liberando múltiples neurotransmisores (NT) (DA, A, ACh, ATP...) cuya función sigue siendo a día de hoy controvertida (Verna, 1997).

El grupo del Dr. González mantiene la hipótesis dopaminérgica con un papel importante de la dopamina en la transmisión aferente del CC. Esta hipótesis se sustenta en el alto contenido de DA en las CQ del CC y en la estrecha correlación existente entre intensidad del estímulo, liberación de CA y nivel de activación de las fibras aferentes del NSC (Fidone y González, 1982; González *et al.*, 1994). Esta es la razón por la que en este trabajo evaluemos la secreción de DA como medida de la actividad global de las CQ y su correlación con los cambios del calcio intracelular en diferentes situaciones, para evaluar aspectos sobre la homeostasis de Ca^{2+} durante la estimulación y recuperación post-estimulación que aún no han sido estudiados. A continuación presento un breve resumen sobre los datos publicados sobre el tema.

1.6.1. Mecanismos de la membrana plasmática

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son la principal vía de acceso del Ca^{2+} a través de la membrana de todas las células excitables y, en concreto, en las células quimiorreceptoras de CC estos canales están claramente involucrados en la liberación de NT. Aunque parecen existir discrepancias debidas a las diferencias entre especies, todos los estudios coinciden en que las CQ poseen canales de Ca^{2+} de alto umbral, tanto de tipo L como de otros tipos (López-López, 1997) siendo los de tipo L, sensibles a dihidropiridinas, la principal vía de entrada de Ca^{2+} para la secreción de NT en CC de conejo y rata (Obeso *et al.*, 1992; Rocher *et al.*, 2005). A pesar de que Buckler y Vaughan-Jones (1998) encontraron que sólo el 60-70% del aumento de Ca^{2+} intracelular inducido por hipoxia es sensible a dihidropiridinas (DHP) y que otras técnicas electrofisiológicas y moleculares (PCR e inmunohistoquímica) revelan la expresión de varios tipos de VOCCs de HVA: $Ca_v1.2$ (tipo L) y $Ca_v2.2$ (tipo N) en CQ de CC de rata (Cayzac *et al.*, 2009), parece claro que el acoplamiento de la entrada de calcio con la secreción es más eficaz a través de los canales tipo L, siendo hasta el 90% de la secreción sensible a DHP (Cáceres *et al.*, 2009). Esto elimina la posibilidad de que los canales tipo N u otros, como los tipo P/Q o R, contribuyan en CQ de rata a la entrada de calcio para la exocitosis cosa que sucede en las CQ de conejo, donde los P/Q tienen una contribución creciente a medida que aumenta la intensidad del estímulo de hipoxia (Rocher *et al.*, 2005).

Además de los VOCCs de alto umbral se han descrito canales de bajo umbral (tipo T) en las células tipo I, en concreto la isoforma $Ca_v3.1$ ($\alpha 1G$). Estos canales participan en la activación por hipoxia del CC de rata ya que su inhibición farmacológica con mibefradil bloquea la respuesta secretora inducida por hipoxia hasta un 50% (Cáceres *et al.*, 2009). Se cree que su contribución es mayor a la apertura de los canales L (por ser de menor umbral) que a la entrada de calcio cuantitativamente significativa, debido a su carácter transitorio.

En cuanto a los canales de Ca^{2+} independientes de voltaje, que podrían representar vías adicionales de entrada de Ca^{2+} , como los canales de Ca^{2+} regulados por receptor o por depósito, en la actualidad no disponemos de información sobre éstos en CQ de CC.

Finalmente, el Ca^{2+} que ha entrado en las células durante su estimulación tiene que ser eliminado para restablecer el nivel basal de Ca^{2+}_i . Dado que la bomba ATPasa de Ca^{2+} (PMCA) y el intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (NCX) de la membrana plasmática son las principales vías de extrusión de Ca^{2+} intracelular en cualquier célula, asumimos que actúan también en las CQ de CC. Estudios previos del grupo demuestran que la implicación de la PMCA en CC de rata y conejo es más bien escasa

(Conde *et al.*, 2006). El tratamiento con La^{3+} , un inhibidor de las bombas tipo P que en terminaciones neurohipofisarias produce un aumento del doble de la respuesta secretora (Sasaki *et al.*, 2005), no tiene efecto en la actividad de las CQ. Esto implica que la PMCA no tiene un papel importante en la homeostasis de Ca^{2+} de las CQ o, alternativamente, que el La^{3+} no sea eficaz para el bloqueo de la isoforma expresada en dichas células (Conde *et al.*, 2006).

Un último aspecto importante a considerar es que la regulación del calcio intracelular sucede principalmente a través de la modulación de la entrada de calcio y esto puede suceder a través del control del potencial de membrana, mediante activación de los canales de K^+ , o de la inhibición directa de los canales de Ca^{2+} . Se sabe que los canales tipo L pueden ser regulados en general de múltiples formas, incluso por hipoxia (Franco-Obregón *et al.*, 1995). Entre los moduladores propuestos en las CQ se encuentra la espermina, una poliamina almacenada en vesículas sinápticas (Masuko *et al.*, 2003) que por su naturaleza policatiónica tiene afinidad, como otros cationes mono o divalentes, por canales iónicos y receptores involucrados en el transporte de Ca^{2+} (Li *et al.*, 2007). Cayzac *et al.* (2009) demostraron que el tratamiento con espermina inhibe la excitación de CA en CC debido a la inhibición de los canales tipo L. Aunque actualmente no disponemos de datos que pongan de manifiesto la presencia de esta poliamina en el CC, parece razonable asumir que las células tipo I contengan espermina en sus vesículas y que se liberen junto con los NT. Si este fuera el caso, la secreción de espermina durante la estimulación del CC limitaría la propia entrada de calcio por despolarización al inhibir los canales tipo L (Cayzac *et al.*, 2009).

Este mecanismo inhibitorio regulador no es único ya que se ha descrito también para el ATP, adenosina y GABA actuando sobre receptores presinápticos. La adenosina actuando sobre receptores A_1 inhibe corrientes de calcio tipo L en CQ de conejo y la correspondiente secreción de CA (Rocher *et al.*, 1999); el GABA a través de autorreceptores GABA_B es capaz de reactivar corrientes de K^+ background disminuyendo la despolarización (Fearon *et al.*, 2003). El ATP produce un efecto similar limitando la despolarización de las CQ durante la hipoxia, disminuyendo la entrada de calcio (Piskuric y Nurse, 2012) Estos mecanismos de feedback limitarían la liberación de NT actuando de forma autocrina o paracrina.

1.6.2. Depósitos intracelulares: Retículo endoplasmático y mitocondria

Respecto a la contribución de los depósitos intracelulares en el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por hipoxia y alto K^+ extracelular, Vicario *et al.* (2000) demostraron en CC de conejo, y posteriormente en rata (Conde *et al.*, 2006), que los agentes clásicos utilizados para movilizar Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (rianodina, IP_3 , agonistas muscarínicos) y que inducen un aumento de Ca^{2+} transitorio en otros tipos celulares, tienen muy poca capacidad de movilizar Ca^{2+} hacia el citosol de las CQ. Tampoco ninguno de los agentes conocidos para promover el vaciado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , alterando su capacidad de almacenamiento del mismo a través de la inhibición de la SERCA (tapsigargina, TBH) produjeron cambios en los niveles de Ca^{2+}_i por encima del umbral o modificaron la actividad secretora de las CQ. Esto implica que las células quimiorreceptoras de CC de conejo y rata dependen casi exclusivamente de los mecanismos de la membrana plasmática (canales de Ca^{2+} , PMCA e intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) para controlar la secreción y para mantener su homeostasis de Ca^{2+} .

Respecto al posible papel de la mitocondria en la homeostasis del calcio en las CQ del CC no disponemos de ningún dato hasta el momento, a pesar de que en otros tipos celulares actúa como importante tampón de calcio intracelular.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis de trabajo se basa en que el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), al ser de gran capacidad de transporte y baja afinidad para el calcio (resultando lo contrario la PMCA), y ser especialmente importante en células excitables, puede jugar un papel fundamental en la homeostasis de calcio intracelular de las células quimiorreceptoras de cuerpo carotídeo, regulando el acoplamiento excitación-secreción de las mismas, de manera similar a lo que ocurre en los cardiomiocitos, donde el NCX actúa incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con celeridad, primero, y permitiendo después la salida rápida de Ca^{2+} del citosol, controlando el acoplamiento excitación-contracción.

El **objetivo general** del presente trabajo fin de máster es contribuir al conocimiento de los mecanismos involucrados en la homeostasis de calcio intracelular en células quimiorreceptoras de cuerpo carotídeo, especialmente a través del sistema de contra-transporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Este objetivo global se puede desglosar en los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar la existencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) en las células quimiorreceptoras de cuerpo carotídeo de rata y comprobar su actividad en modo reverso.
2. Caracterizar el papel funcional del intercambiador NCX de la membrana plasmática de las células tipo I de CC ante un estímulo hipóxico y con una despolarización inespecífica (alto K^+_e).
3. Analizar la expresión de algunas proteínas implicadas en la homeostasis de calcio celular en las CQ: Canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente tipo L ($\text{Ca}_v1.2$), intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y uniportador de calcio mitocondrial (MCU).
4. Estudiar el papel de la mitocondria en la regulación de la homeostasis de calcio y liberación de neurotransmisores en CQ mediante el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Todos los experimentos de este trabajo han sido realizados en **ratas Wistar** de 250-350 g de peso mantenidas a 20-23°C en ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y alimentadas *ad libitum*.

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (60mg/kg) administrado por vía intraperitoneal. Después de practicarles una traqueotomía se les extrajeron las **bifurcaciones de las arterias carótidas** y se disecaron en una cámara de lucita con una solución Tyrode cirugía a 0-4°C (NaCl 140mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, Hepes 10mM y glucosa 5mM (pH 7,4 ajustado con NaOH)), equilibrado con 100% O₂, eliminando todos los restos de tejido conectivo que rodean al CC (**Fig. 6**). Una vez extraídos los tejidos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis intracardiaca de pentobarbital.

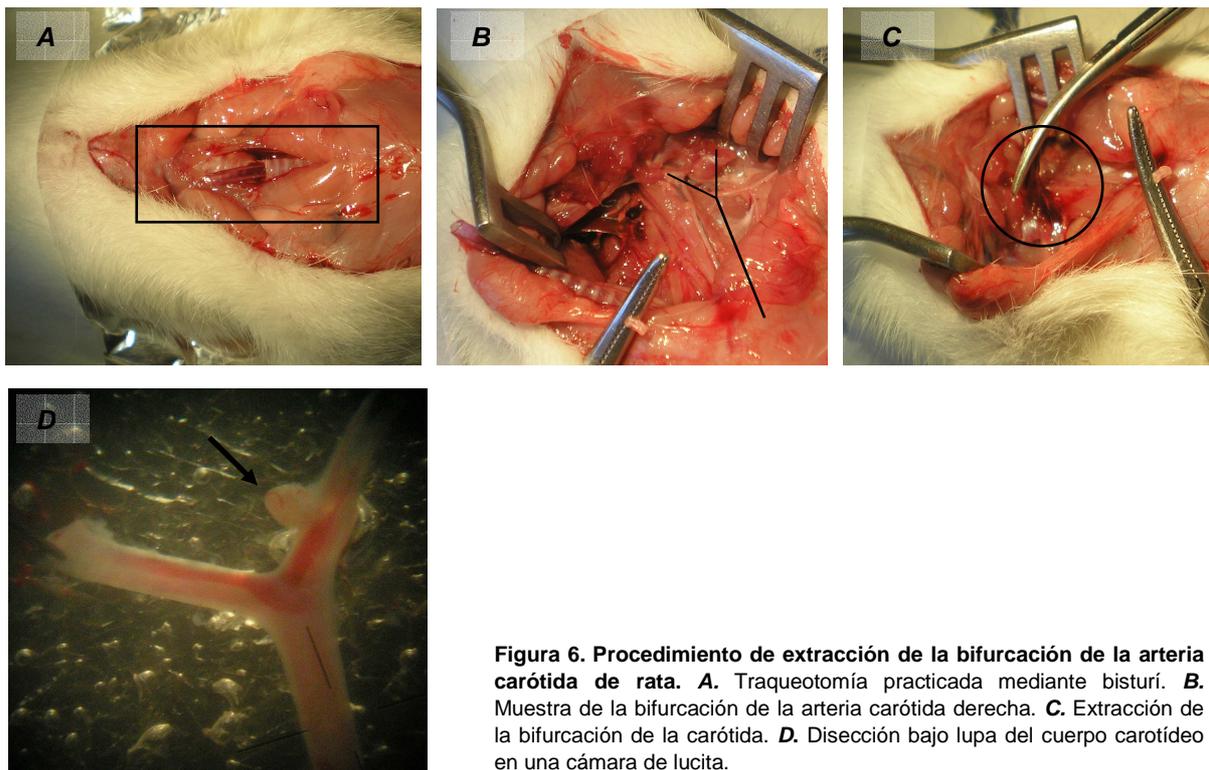


Figura 6. Procedimiento de extracción de la bifurcación de la arteria carótida de rata. **A.** Traqueotomía practicada mediante bisturí. **B.** Muestra de la bifurcación de la arteria carótida derecha. **C.** Extracción de la bifurcación de la carótida. **D.** Disección bajo lupa del cuerpo carotídeo en una cámara de lucita.

Los tejidos extraídos fueron procesados de distinta manera según su finalidad. Los CC destinados a experimentos de medida de síntesis y secreción de CA, inmunocitoquímica o medida de fluorescencia fueron utilizados en fresco, mientras que los tejidos cuya finalidad era la extracción de proteínas para la realización de Western Blot fueron inmediatamente congelados en N₂ líquido y conservados a -80°C hasta su utilización.

3.2. CULTIVO DE CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS DE CC

Los CC aislados fueron disociados enzimáticamente en dos pasos consecutivos. Primero se incubaron en 2ml de solución Tyrode (0Ca²⁺ 0Mg²⁺) conteniendo collagenasa (2,5mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA 6mg/ml) a 37°C durante 10 min. Segundo, tras retirar la solución con el enzima, se incubaron nuevamente con 2ml de la misma solución Tyrode conteniendo 1mg/ml de tripsina y 6mg/ml de BSA a 37°C durante 8 min.

Eliminada la solución enzimática, se añadieron 1,5ml de medio de cultivo DMEM (Sigma) a 4°C, y con ayuda de una pipeta Pasteur se disgregaron mecánicamente los CC. Se centrifugaron las muestras a 1800rpm durante 5 min y una vez eliminado el sobrenadante se resuspendió el pellet en 100-120µl de medio DMEM a 37°C. A continuación, se sembraron las células disociadas en cristalitos (cubreobjetos) recubiertos con poli-L-lisina (Sigma) en gotas de 25µl, y se dejaron en el incubador durante 1 hora a 37°C (20% O₂, 5% CO₂, resto N₂). Al cabo de este tiempo se añadió 500µl de medio DMEM a los pocillos con los cristalitos y se incubaron durante toda la noche para una buena adherencia.

3.3. INMUNOCITOQUÍMICA

Se ha utilizado esta técnica para detectar la presencia o ausencia de las proteínas objeto de estudio y su co-localización con TH (tirosina hidroxilasa) como medida de su expresión en las células quimiorreceptoras. Es decir, para identificar si las células que expresaban una determinada proteína eran o no quimiorreceptoras, se realizaron siempre **inmunomarcajes dobles** usando un anticuerpo anti-TH como marcador de las células tipo I y un anti-GFAP como marcador de las células tipo II.

Los cultivos celulares de CC disociados en fresco se lavaron tres veces con 1ml de tampón fosfato salino (PB 10mM, NaCl 150mM, pH 7,4) para eliminar restos de fenol del medio. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PB 100mM en cantidad suficiente para cubrir completamente los cristales sembrados, dejándolos a temperatura ambiente durante 10 minutos y se repitieron los lavados con PBS una vez fijadas las células. A continuación, se incubaron con solución de permeabilización-bloqueo (PB 10mM, NaCl 0,6M, Tritón X-100 0,1% y 2% de suero de cabra no inmunizada) para facilitar la entrada del anticuerpo y bloquear las uniones inespecíficas.

Después del bloqueo y permeabilización se procede a la incubación secuencial con los anticuerpos, previamente diluidos en la solución de bloqueo. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó a 4°C durante toda la noche. Después de varios lavados con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con sus respectivos fluoróforos durante una hora en oscuridad y a T^a ambiente. Se utilizó doble marcaje: **FITC** (verde) para localizar en cada caso el anticuerpo primario monoclonal simultáneamente junto con **Alexa 594** (rojo) para evaluar la co-localización en la expresión de proteínas específicas unidas al anticuerpo primario policlonal. Además, en todos los experimentos se incluyó también en la incubación **DAPI** (azul) para ver tinción de núcleos (**ver tabla 1**). Después de otro ciclo de lavados, los cristales se montan sobre portas con Vectashield H-1000 (Vector Laboratorios). Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio confocal Leica TCS SP5 en el Servicio de microscopía del IBGM.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN
Ratón anti TH	1:1000	Conejo anti GFAP	1:1000	Anti-IgG conejo-Alexa 594 Anti-IgG ratón-FITC	1:1000 1:1000
		Conejo anti Ca _v 1.2	1:50		
		Conejo anti MCU	1:100		
Conejo anti TH	1:1000	Ratón anti NCX	1:50	DAPI	1:4000
Conejo anti GFAP	1:1000				

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones empleadas en inmunocitoquímica.

3.4. MEDIDA DE FLUORESCENCIA EN CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS DE CC

3.4.1. Medida de concentración libre de calcio en el citosol con Fura-2-AM

El Fura-2 es un quelante de Ca^{2+} fluorescente y una molécula altamente polar muy hidrofílica, incapaz de atravesar las membranas celulares. Por ello utilizamos un derivado hidrofóbico con los 5 grupos ácidos esterificados, el penta-acetoximetiléster (Fura-2-AM), permeable a la membrana.

El Fura-2-AM tiene una K_d de 224 nM permitiendo medir calcio en el rango 0,1-2 μM . La $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se estima a partir del cociente de las fluorescencias emitidas cuando excitamos a 340 nm y a 380 nm. El colorante posee la característica de ser ratiométrico lo que permite que las $[\text{Ca}^{2+}]_c$ medidas sean independientes de la cantidad de colorante acumulado dentro de la célula permitiendo eliminar artefactos que afectan a las fluorescencias de cada longitud de onda.

La estequiometría de la unión del Ca^{2+} y el Fura-2 es 1:1, de acuerdo a la ley de masas se puede derivar la ecuación (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

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

donde K_d es la constante de disociación del Ca^{2+} y el Fura-2, F es la fluorescencia emitida a una concentración de Ca^{2+} conocida ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), F_{\max} es la fluorescencia emitida cuando el colorante se encuentra saturado y F_{\min} es la fluorescencia emitida en ausencia de Ca^{2+} . Esta ecuación se puede aplicar a ambas longitudes de onda utilizadas, y la ecuación resultante es la siguiente:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times \beta \times [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)]$$

donde R es el cociente de las fluorescencias excitadas a 340 y 380 nm para una concentración de Ca^{2+} conocida. R_{\max} representa el cociente de ambas fluorescencias cuando el colorante se encuentra saturado por Ca^{2+} y R_{\min} representa el cociente de ambas fluorescencias en ausencia de Ca^{2+} . β representa el cociente F_{\max}/F_{\min} para la longitud de onda 380 nm. Esta ecuación permite calcular la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a partir del cociente entre ambas longitudes de onda (R). R_{\min} fue determinada en células cargadas en medio sin calcio con Fura-2 y el quelante BAPTA y perfundidas con medio externo (NaCl 145mM, KCl 5mM, MgCl_2 1mM, HEPES 10mM, pH 7,4) conteniendo EGTA hasta alcanzar un nivel mínimo de R . R_{\max} fue determinada en células incubadas con medio externo conteniendo Ca^{2+} 10 mM y tratadas con ionomicina 2 μM hasta alcanzar niveles máximos de R .

3.4.2. Equipo de imagen de fluorescencia

El sistema de imagen del que disponemos (**Fig. 7**), permite medir variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en célula única. Para ello, las células se siembran en cristallitos de 12mm de diámetro. Este se coloca en una cámara de perfusión por la que pasan las soluciones calentadas a 37°C través de un calentador acoplado a la vía de perfusión (Harvard Apparatus). La cámara de perfusión se acopla a un microscopio invertido de fluorescencia (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena, Germany) y está conectada a un sistema de válvulas electrónico que permite perfundir 8 soluciones diferentes de forma independiente.

El sistema consiste en una lámpara de xenón (Cairn), cuya intensidad determina la cantidad de luz que pasa a través del monocromador Cairn. La luz que atraviesa el monocromador es reflejada en un espejo dicróico 400DCLP y excita a 340 y 380 nm las células. A continuación, la luz que emiten las células es recogida por un objetivo Fluar 40X, y se filtra con un filtro de emisión D510/80 que deja pasar la luz a longitudes de onda entorno a 510 nm. La luz emitida es capturada por una cámara digital Hamamatsu ORCA-ER. El procesamiento digital de las imágenes permite el análisis simultáneo de todas las células presentes en el campo. El sistema es controlado por el programa Metafluor 6.0 software (Universal Imaging Corporation).

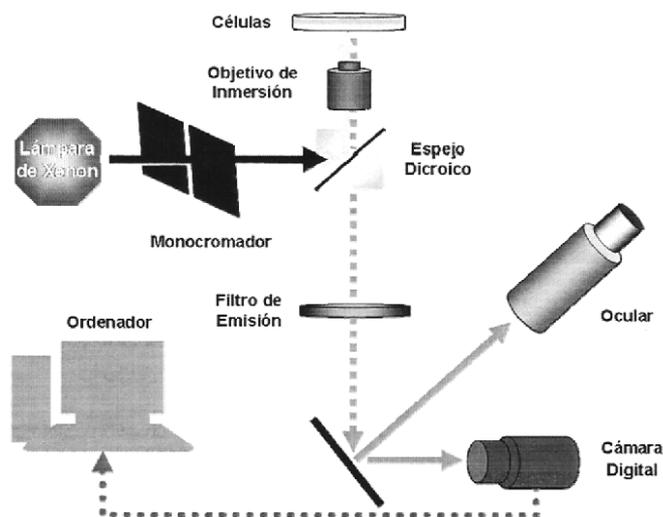


Figura 7. Sistema de imagen de medida de calcio. La lámpara de xenón produce la luz que atraviesa el monocromador, la luz que pasa se refleja en el espejo dicroico y excita las células situadas en el microscopio. Las células al excitarse emiten luz a longitudes de onda mayores de 500 nm que atraviesa el espejo dicroico, pasa a través de filtro de emisión y es capturada por una cámara digital. Los datos son procesados y analizados con el programa Metafluor.

3.4.3. Determinación experimental de medidas de fluorescencia

Las medidas de la $[Ca^{2+}]$ libre en el citosol se llevaron a cabo en el cultivo de células de la disociación de los CC, cargadas con el colorante fluorescente Fura-2. Las células fueron incubadas en medio externo con Ca^{2+} en presencia de Fura-2-AM 2 μ M durante 60 min a T^a ambiente en agitación y oscuridad. Después, las células fueron lavadas con el mismo medio externo sin Fura-2 durante 10 min a T^a ambiente. Finalmente, se colocó el cristal en la cámara de perfusión acoplada al microscopio invertido de fluorescencia. Las células fueron excitadas a 340 nm y a 380 nm usando el monocromador Cairn (100ms de excitación a cada longitud de onda cada 2s, 10nm de ancho de banda). Durante el experimento se perfundió solución Tyrode/ HCO_3 y suplementado con los diferentes estímulos, solución 0mM Na^+ y 35mM K^+ , con el gaseo correspondiente (**ver Tabla 2**): 5% CO_2 - 20% O_2 - resto N_2 (Normoxia; pH~7,4); 5% CO_2 - 95% N_2 (hipoxia; pH~7,4); 10% CO_2 - 90%Aire (Hiperapnia; pH~7,1).

3.5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS: LIBERACIÓN DE CATECOLAMINAS POR EL CUERPO CAROTÍDEO

Para estudiar la respuesta *in vitro* de los CC a los diferentes estímulos, se ha medido la liberación de CA marcando isotópicamente sus depósitos mediante tirosina tritiada (3,5 3H -Tyr). La tirosina es el precursor natural de las CA y dado el elevado recambio de las mismas en el CC, una cantidad importante de los depósitos quedan marcados radioactivamente (Fidone y González, 1982). A continuación, se describe cómo se realizaron estos experimentos.

3.5.1. Marcaje de los depósitos de CA de células quimiorreceptoras

En cada experimento se emplean 12 CC de rata y se incuban en viales de vidrio con solución Tyrode equilibrado con O_2 , en un baño con agitación, a 37°C durante 2 horas. La solución de incubación contiene tirosina tritiada (3,5 3H -Tyr; Amersham Ibérica, Madrid) de alta actividad específica (48Ci/mmol) a una concentración de 30 μ M para marcar los depósitos intracelulares de CA. El medio de incubación contiene además 0,1mM de DL-metiltetrahidro-biopterina (cofactor de tirosina hidroxilasa) y 1mM de ácido ascórbico (antioxidante y cofactor de dopamina β -hidroxilasa, otra enzima participante en la síntesis de CA). La presencia de estos dos cofactores optimiza el marcaje de los depósitos de CA (Fidone y González, 1982).

3.5.2. Liberación de $^3\text{H-CA}$

Después del periodo de marcaje, los CC son transferidos por separado a viales nuevos. Se lavan durante una hora en solución Tyrode-bicarbonato (**ver Tabla 2**) sin precursor ni cofactores y se mantienen en agitación a 37°C, renovando la solución cada 20 min para facilitar el lavado del precursor radiactivo. Las soluciones de incubación son continuamente gaseadas con 20%O₂ - 5%CO₂ - resto N₂ (pH 7,4) saturado con vapor de agua.

COMPUESTO	TYRODE CIRUGÍA	TYRODE NAHCO ₃	0 MM NA ⁺	35 MM K ⁺
NaCl	140 mM	116 mM	--	86 mM
KCl	5 mM	5 mM	5 mM	35 mM
CaCl ₂	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
MgCl ₂	1,1 mM	1,1 mM	1,1 mM	1,1 mM
Glucosa	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10mM
NaHCO ₃	--	24 mM	--	24 mM
ChCl	--	--	116 mM	--
ChHCO ₃	--	--	24 mM	--

Tabla 2. Soluciones Tyrode utilizadas en cirugía, en las incubaciones de los tejidos, solución 0mM de Na⁺ y solución alto K⁺ (35mM). El pH fue ajustado a 7.4 a las temperaturas a las que se emplearon en cada caso (0-4°C en cirugía y lavado de los tejidos (NaOH) y 37°C en las incubaciones para experimentos de liberación de CA y en los de medida de fluorescencia, gaseando con CO₂).

Después de los lavados comienza el experimento de liberación propiamente dicho. Se mantienen los CC con el mismo gaseo, excepto cuando el estímulo es hipoxia, aplicando el estímulo con su curso temporal apropiado. Se recogen las soluciones de superfusión cada 10 min por medio de un sistema de jeringas que permite la recogida y el rellenado de los viales con soluciones nuevas de forma rápida. Las soluciones recolectadas se acidifican a pH 3.2 con una mezcla de ácido acético glacial y ácido ascórbico para evitar la degradación de las CA y se guardan a 4°C para su posterior análisis en un contador de centelleo. Al final del experimento los CC se homogenizan a 4°C con ácido perclórico 0.4 N en un homogenizador cristal-cristal y se centrifugan durante 10 min a 15.000xg a 4°C. El sobrenadante es procesado para analizar su contenido en $^3\text{H-CA}$.

3.5.3. Análisis de $^3\text{H-CA}$

El análisis de las $^3\text{H-CA}$ presentes en las soluciones recolectadas está basado en la capacidad de la alúmina ácida para absorber CA, y sus catabolitos con estructura catecol, a pH alcalino y la posibilidad de eluirlos a pH ácido (Fidone y González, 1982). La alúmina ácida (100mg, BioRad) se añade a los viales que contienen las soluciones recolectadas se llevan a pH 8,6 con Tris 2M. La alúmina se transfiere a columnas de vidrio, se lava con agua destilada para arrastrar cualquier otro producto retenido por la alúmina y finalmente las CA son eluidas con 1 ml HCl 1N al que se añade líquido de centelleo (Optiphase "Hisafe" 3, Perkin Elmer) para contar en un contador de centelleo beta. El mismo proceso se sigue para analizar el contenido en $^3\text{H-CA}$ de los CC homogenizados.

3.6. WESTERN BLOT

Mediante la técnica de “Western blot” o “Immunoblotting” detectamos la expresión de las distintas proteínas mediante anticuerpos específicos. Los extractos proteicos fueron obtenidos tras la homogenización de **CC** y **GCS** (ganglio cervical superior) con un buffer de lisis conteniendo detergentes e inhibidores de proteasas. Dicho procedimiento se realizó en hielo y los extractos se centrifugaron a 4°C. Las proteínas solubilizadas se mezclaron con igual volumen de buffer de muestra (2x) conteniendo Tris-HCl 125mM pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol y 0,02% de azul de bromofenol. Las muestras se hirvieron durante 5 min y las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 8%. El gel concentrador fue del 3%.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron por el método húmedo en un buffer de transferencia conteniendo Tris 25mM, glicina 192mM y 20% metanol (pH 8,3) a membranas de PVDF (Immobilon™-P, Millipore) en un Mini Trans-blot de Bio-Rad. Después de bloquear la membrana con 5% de leche en polvo desnatada diluida en TBS-T (buffer Tris salino 10mM con 0,1% Tween 20), se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para cada una de las proteínas de interés y posteriormente con el anticuerpo secundario adecuado, según la especie animal en el que hubiera sido crecido el primero, anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano (**ver tabla 3**). Todos los anticuerpos fueron resuspendidos en TBS-T con 0,1% de BSA para bloquear las interacciones inespecíficas.

Las bandas detectadas mediante quimioluminiscencia (Kit ECL, Amersham Biosciences) fueron analizadas con el software ImageJ.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN
Ratón anti β-actina (abcam)	1:1000	Conejo anti IgG ratón-HRP (abcam)	1:5000
Ratón anti TH (abcam)	1:1000		
Ratón anti NCX (abcam)	1:200	Conejo anti IgG ratón-HRP (abcam)	1:2000
Ratón anti Ca _v 1.2 (L) (Santa Cruz Biotechnology)	1:250		
Conejo anti MCU (Epitomix)	1:600	Cabra anti IgG conejo-HRP (abcam)	1:2000

Tabla 3. Anticuerpos y diluciones empleadas en Western Blot.

Habitualmente, después de una primera incubación con los anticuerpos de interés y el revelado para ver la expresión de la proteína problema, se realizaba un *stripping* de la membrana y una segunda incubación de la misma con el anticuerpo anti β-actina. De este modo realizábamos un control interno de carga y de que la transferencia de las proteínas a la membrana se había realizado de forma similar. El protocolo de *stripping* de las membranas consiste en una incubación con Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, 2% SDS, 2-mercaptoetanol 100mM) durante 40 min a 60°C, con lo que la membrana queda libre de anticuerpos y lista para ser reutilizada tras los lavados y bloqueo.

4. RESULTADOS

4.1. PUESTA A PUNTO DE MEDIDA DE CALCIO EN CQ: RESPUESTAS A ESTIMULOS DE K^+ , HIPOXIA E HIPERCAPNIA

Antes de comenzar a analizar los posibles mecanismos homeostáticos de calcio de las CQ de CC de rata, hemos puesto a punto el cultivo celular y el método de medida de calcio en dichas células caracterizando los dos tipos celulares de CC y su respuesta a los diferentes estímulos. Dado que se trata de un cultivo primario con células disociadas en fresco para cada experimento, ello nos obligaba a realizar para cada experimento el procedimiento quirúrgico completo y la disociación del órgano, con el riesgo de viabilidad del cultivo y variabilidad que ello conlleva.

Las células adheridas a cada uno de los cristallitos se cargaron con Fura-2-AM según el protocolo descrito en Material y Métodos. Se incubaron con solución Tyrode suplementada según el protocolo aplicado, manteniendo en cada caso la osmolaridad mediante sustituciones iónicas equiosmóticas: alto K^+ (35mM), 100 μ M ATP, 1mM ditionita (hipoxia química), hipoxia (gaseo 5%CO₂ - resto N₂) o hipercapnia (10%CO₂ - 20%O₂ - resto N₂). Esto nos permitió identificar las células por su respuesta de calcio a los diferentes estímulos: ATP en el caso de las células tipo II; alto K^+ , hipoxia e hipercapnia para las células tipo I o CQ.

En la **figura 8A** se observan respuestas individuales típicas de células tipo II: la adición de 100 mM ATP durante 30 segundos dio lugar a un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, posiblemente debido al vaciamiento de calcio de los depósitos intracelulares mediante la activación de los receptores de IP₃ y/o Rianodina del RE. El incremento de $[Ca^{2+}]_i$, variable entre células, fue de 200-500nM.

En la **figura 8B** se muestran respuestas típicas de CQ de CC: aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ tras un pulso de alto K^+ y con incubación con ditionita, compuesto que produce hipoxia al captar el oxígeno de la solución. Respuestas similares se obtienen con hipoxia e hipercapnia (**Fig. 8C**). Estas respuestas son debidas a despolarización de la célula, apertura de VOCCs y entrada de Ca^{2+} desde el exterior. En la parte superior de la **figura 8C** se muestran los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ de un registro representativo (n = 4) donde se aprecia la diferencia entre la respuesta al K^+ y los estímulos hipoxia e hipercapnia.

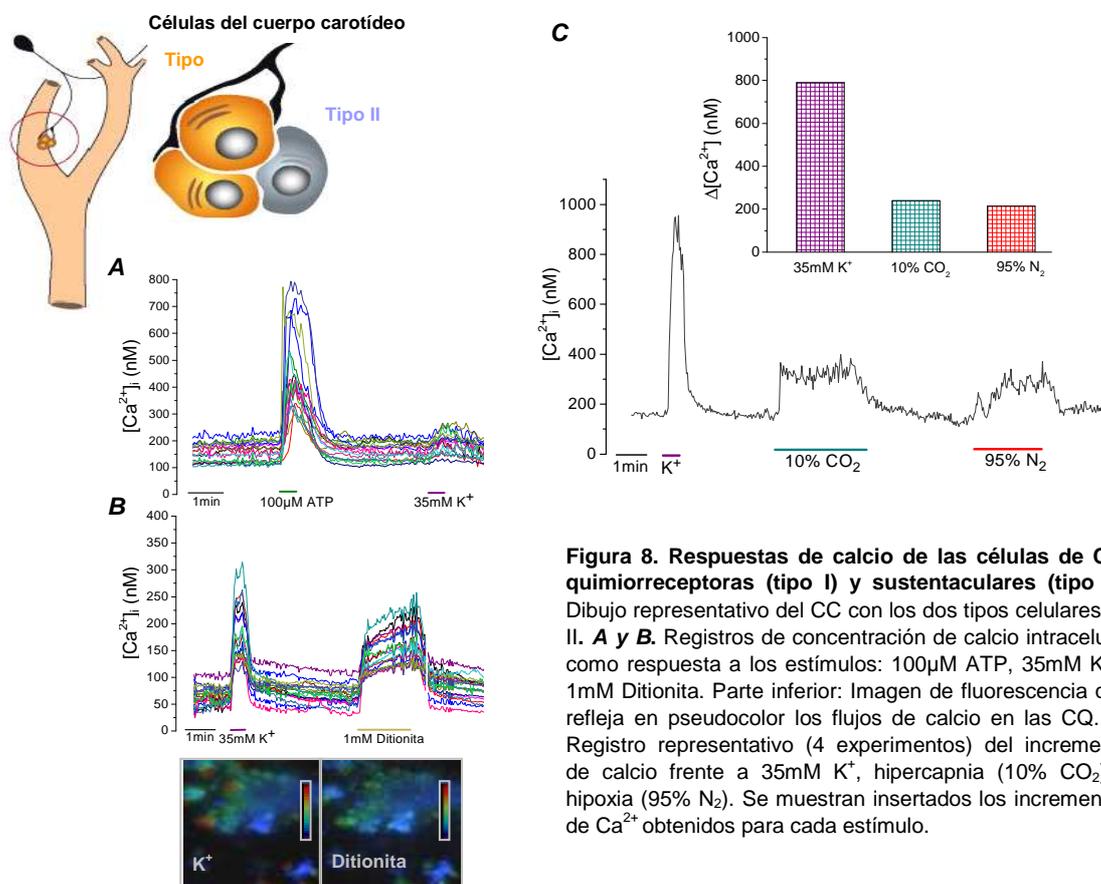


Figura 8. Respuestas de calcio de las células de CC: quimiorreceptoras (tipo I) y sustentaculares (tipo II). Dibujo representativo del CC con los dos tipos celulares I y II. **A y B.** Registros de concentración de calcio intracelular como respuesta a los estímulos: 100 μ M ATP, 35mM K^+ y 1mM Ditionita. Parte inferior: Imagen de fluorescencia que refleja en pseudocolor los flujos de calcio en las CQ. **C.** Registro representativo (4 experimentos) del incremento de calcio frente a 35mM K^+ , hipercapnia (10% CO₂) e hipoxia (95% N₂). Se muestran insertados los incrementos de Ca^{2+} obtenidos para cada estímulo.

4.2. PRESENCIA DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) EN CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS DE CC

El primer objetivo de este trabajo fue poner en evidencia la existencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en las CQ y su posible funcionamiento en modo reverso como mecanismo alternativo de entrada de calcio en estas células. La **figura 9** muestra registros representativos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de un cultivo celular de 24h y respuestas secretoras en forma de ^3H -CA liberadas en CC de rata intacto a partir de su síntesis con ^3H -Tyr. La respuesta tras la superfusión con Tyrode 0mM Na^+ (sustitución equiosmolar con cloruro de colina/bicarbonato de colina) produce un rápido aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, poniendo de manifiesto la entrada de calcio a través del NCX operando en modo reverso (**Fig. 9A**). Este aumento de calcio se traduce en un aumento de CA liberadas por el CC (**Fig. 9A, parte inferior**).

Comprobamos que esta interpretación fuera la correcta, primero, analizando si dicho efecto se eliminaba mediante inhibición del NCX y segundo, comprobando la posibilidad de que la entrada de calcio se debiera a la activación de canales por despolarización de la membrana. En la **figura 9B** se muestra cómo la adición de 5mM de NiCl_2 (inhibidor inespecífico del NCX) a la solución 0 mM de Na^+ elimina el efecto del 0Na^+ tanto sobre la respuesta de calcio como la secretora. En los registros de Ca^{2+} se observa también que una vez activada la célula con 0Na^+ se generan oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} y esta actividad es inhibida por Ni^{2+} , actuando bien sobre el NCX, bien sobre canales de calcio voltaje-dependientes.

Para aclarar esta doble posibilidad probamos el efecto de una DHP, el nifedipino, sobre el efecto del 0Na^+ . Como se puede observar en la **figura 9D** la aplicación de este inhibidor de canales de calcio tipo L produce una disminución drástica de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Sin embargo, el nifedipino no tiene efecto sobre la respuesta al 0Na^+ , es decir, cuando activamos el modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Una vez eliminados ambos estímulos se produce un efecto rebote que hace que la célula no recupere sus niveles basales de Ca^{2+} intracelular.

Finalmente, en la **figura 9C** se observa cómo la aplicación extracelular de un inhibidor del NCX actuando en modo reverso (NCX_{REV}), el compuesto KB-R7943, atenúa significativamente el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovido por la eliminación de Na^+ extracelular. Esto no parece correlacionarse con el efecto sobre la liberación de CA, ya que el KB-R7943 no tiene efecto inhibitorio sobre la respuesta secretora promovida por el 0Na^+ (**Fig. 9C inferior**).

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la existencia del NCX en las CQ y su capacidad de introducir calcio al citosol en magnitud suficiente para promover una respuesta secretora.

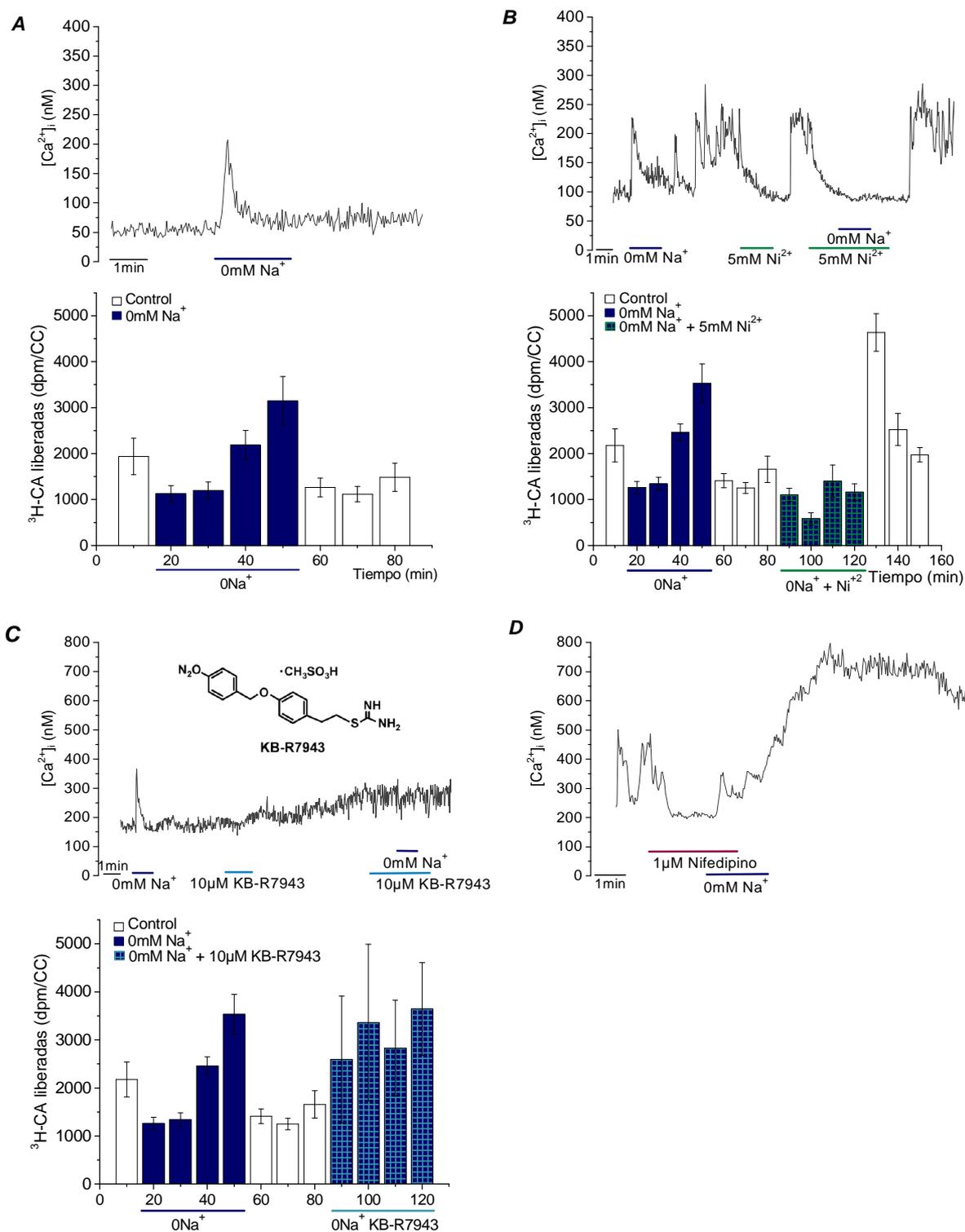


Figura 9. Respuestas de calcio y secretora de las CQ tras la activación del intercambiador Na^+/Ca^{2+} en su modo reverso, alterando el gradiente de Na^+ (0 mM Na^+). Efecto de los inhibidores Ni^{2+} y KB-R7943. A. Respuesta de calcio (parte superior) y respuesta secretora (parte inferior) por activación del modo reverso del intercambiador NCX mediante incubación con 0mM de Na^+ . **B.** Inhibición reversible con 5mM Ni^{2+} de la respuesta a 0 Na^+ así como de las oscilaciones de calcio espontánea. Parte inferior: inhibición por Ni^{2+} de la secreción de CA. **C.** Registro representativo del curso temporal de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 0mM Na^+ en ausencia y presencia de KB-R7943 y su efecto sobre la liberación de CA. **D.** Efecto del nifedipino (1 μ M) sobre la respuesta de calcio promovida por activación del NCX_{REV}. Los datos de liberación de 3H -CA son medias \pm SEM de 4 CC.

4.3. PAPEL FUNCIONAL DEL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) EN CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS DE CC

En las células quimiorreceptoras de CC, sabemos que en el proceso de la transducción al estímulo hipóxico intervienen canales de K^+ reversiblemente inhibidos por hipoxia. Esta inhibición produce una despolarización y activación de canales de Na^+ y de Ca^{2+} , con el consiguiente aumento del Ca^{2+}_i , que dispara la liberación de NT. En el contexto del presente trabajo quisimos evaluar si el NCX contribuye a la respuesta global de secreción de NT, bien facilitando la entrada de Ca^{2+} o su extrusión para la recuperación de los niveles basales.

Con este objetivo de definir el papel funcional del NCX realizamos el siguiente grupo de experimentos en los que evaluamos el impacto de activar el NCX_{REV} (0Na^+) o de inhibir el NCX (KB-R7943) sobre la respuesta a calcio promovida por alto K^+ (35mM) e hipoxia (95% N_2 o 1mM Ditionita). A priori, sería esperable que tanto la activación del intercambiador en modo reverso como su inhibición en modo directo aumentarían los niveles de Ca^{2+} intracelular y la secreción de CA promovidos por la despolarización del alto K^+ y la de la hipoxia. Como se observa en la **figura 10A-B**, en soluciones carentes de Na^+ la respuesta de aumento de Ca^{2+} y la liberación de CA inducida por alto K^+ extracelular es notablemente mayor que sus respectivos controles con soluciones conteniendo Na^+ normal.

En la **Fig. 10C-D** se muestra el efecto de eliminar el Na^+ sobre la respuesta a hipoxia ($\text{N}_2 / 5\% \text{O}_2$). Al contrario de lo que sucede con el alto K^+ , tanto la respuesta de calcio como la secretora inducida por la hipoxia desaparecen en ausencia de Na^+ . Hay que resaltar que aunque en el caso de la secreción (**Fig. 10D**) sí se observa una respuesta a la hipoxia en 0Na^+ , aunque atenuada, dicha respuesta, parece ser muy similar a la del 0Na^+ debido al propio efecto de eliminar el Na^+ y no a la hipoxia. Esto lo hemos comprobado calculando los ratios de liberación evocada S2/S1 en los dos ciclos de estimulación: S1 con Na^+ ; S2 con y sin Na^+ (**Fig. 10F**). En el caso de la hipoxia + 0Na^+ su ratio S2/S1 (0.50) es idéntico al del 0Na^+ (0.55) cuando se comparan ambas con su propia respuesta a una hipoxia control (S1), muy por debajo del ratio correspondiente a dos ciclos de hipoxia control ($\text{S2/S1} = 0.8$). La **figura 10E** muestra que la respuesta al 0Na^+ no se ve afectada por la aplicación de una hipoxia previa.

Finalmente, la **figura 10G-H** muestra que el inhibidor del NCX_{REV} , KB-R7943, modifica significativamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y las CA liberadas inducidas por 35mM de K^+ , disminuyendo ambas medidas. Sin embargo, para el caso del estímulo hipóxico (ditionita o 7% O_2) el inhibidor no parece tener efectos significativos ni sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni sobre la secreción de CA, aunque parece mantener la secreción durante más tiempo. En resumen, podemos decir que el KB-R7943 inhibe la respuesta al alto K y no modifica la de la hipoxia, pero en ambos casos retarda la recuperación de la concentración de Ca^{2+} basal después del estímulo.

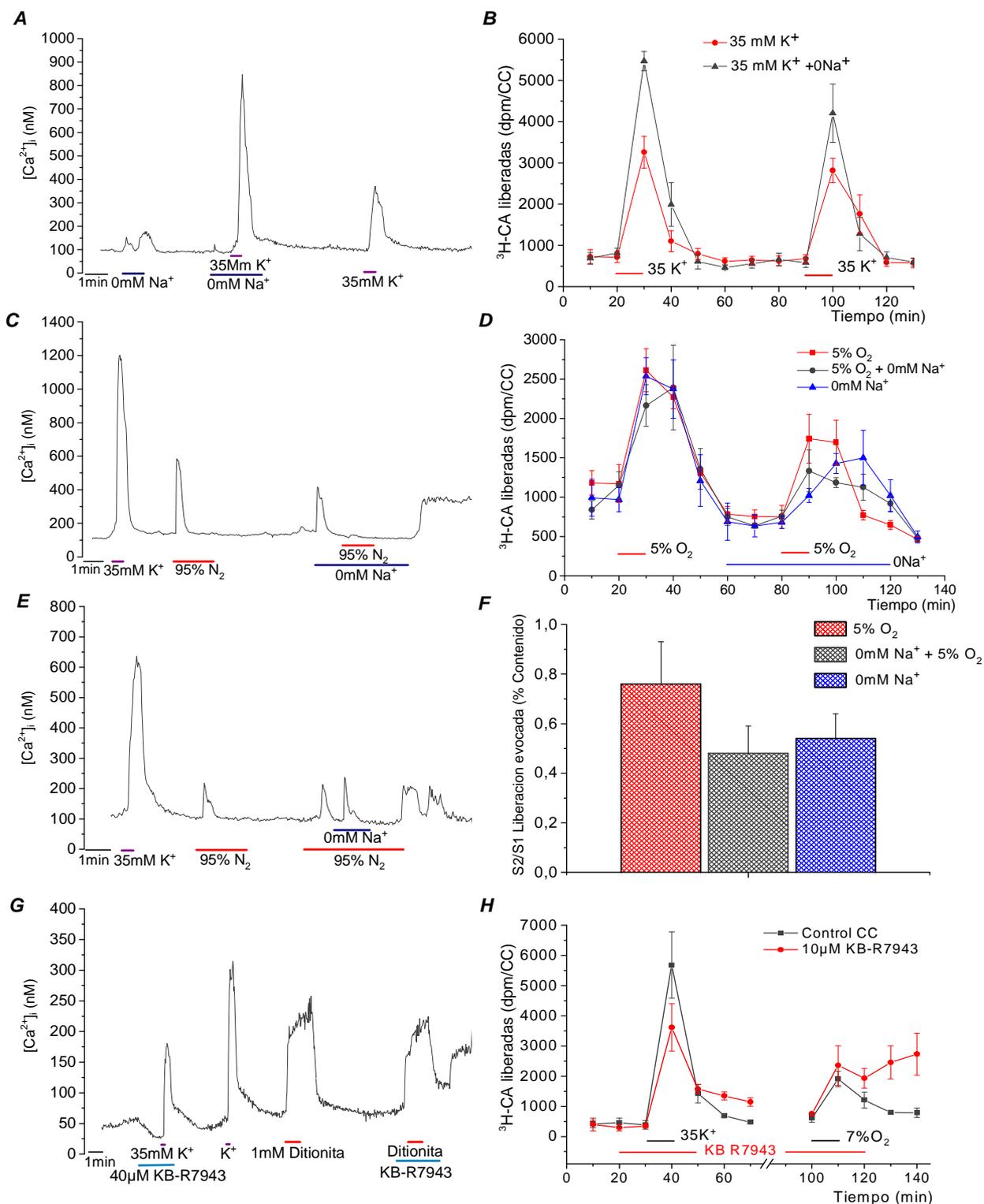


Figura 10. Importancia funcional del intercambiador Na^+/Ca^{2+} : Efecto de la inhibición del NCX. A y B. Efecto potenciador de la eliminación de Na^+ extracelular sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación de 3H -CA inducida por alto K^+ (35mM). **C y D.** Efecto inhibitorio de la eliminación de Na^+ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación de 3H -CA inducida por Hipoxia. **E.** Efecto de la hipoxia sobre $0Na^+$. **F.** Comparación de la respuesta evocada, expresada como S2/S1, en tres condiciones correspondientes a hipoxia, hipoxia en $0Na^+$ y $0Na^+$ solo. **G y H.** Efecto del inhibidor KB-R7943 en $[Ca^{2+}]_i$ y liberación de CA inducido por 35mM de K^+ y 7% O_2 . El KB-R7943 inhibe parcialmente la respuesta secretora al estímulo de alto K^+ , no afecta a la liberación por hipoxia y retarda la recuperación de la concentración de Ca^{2+} post- estímulo. Los datos mostrados en B, D y H son medias \pm SEM de 4 CC.

4.4. EXPRESIÓN DE NCX Y OTRAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO EN CC DE RATA.

4.4.1. Análisis de la expresión mediante Western Blot

El análisis de expresión proteica mediante Western blot se realizó a partir de CC congelados, homogenizados y fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida al 8% según el protocolo detallado en el apartado Material y Métodos. Tras la transferencia húmeda y el bloqueo, las membranas se incubaron secuencialmente con los anticuerpos específicos y las diluciones adecuadas para cada uno de ellos (Tabla 3).

En la **figura 11** se muestran dos geles representativos obtenidos en paralelo. Dado el pequeño tamaño de los CC de rata (50µg) fue muy difícil en algunos casos visualizar las bandas de interés dada la escasez de proteína que se pudo cargar en cada calle. Por ello siempre se utilizó como tejido control ganglio cervical superior (GCS) de las mismas ratas para asegurarnos la validez del anticuerpo. En primer lugar (**Fig. 11B**) se visualizó la TH como marcador de las células quimiorreceptoras y la β -actina como control endógeno de carga (a más cantidad de tejido, más β -actina). En la **figura 11C** se visualizan bandas correspondientes a NCX1, $Ca_v1.2$ y MCU en CC y GCS.

En todos los casos las bandas observadas corresponden al peso molecular esperado para cada una de las proteínas analizadas: ~60 kDa para TH, ~220 kDa para $Ca_v1.2$ y ~40 kDa para MCU, salvo para la isoforma NCX1 del intercambiador Na^+/Ca^{2+} que muestra una banda de ~70 kDa. El anticuerpo monoclonal anti-NCX1 utilizado, reconoce una parte del patrón de la expresión típica de la proteína que comprendería dos bandas con masas moleculares 110 y 70kDa. La banda más pequeña de 70kDa que aparece en el gel, corresponde a la forma corta de NCX1, que es o bien un producto proteolíticamente escindido o una forma funcional incompleta de NCX1 (Zhang *et al.*, 2005). Los experimentos fueron reproducidos 5 veces con el mismo resultado.

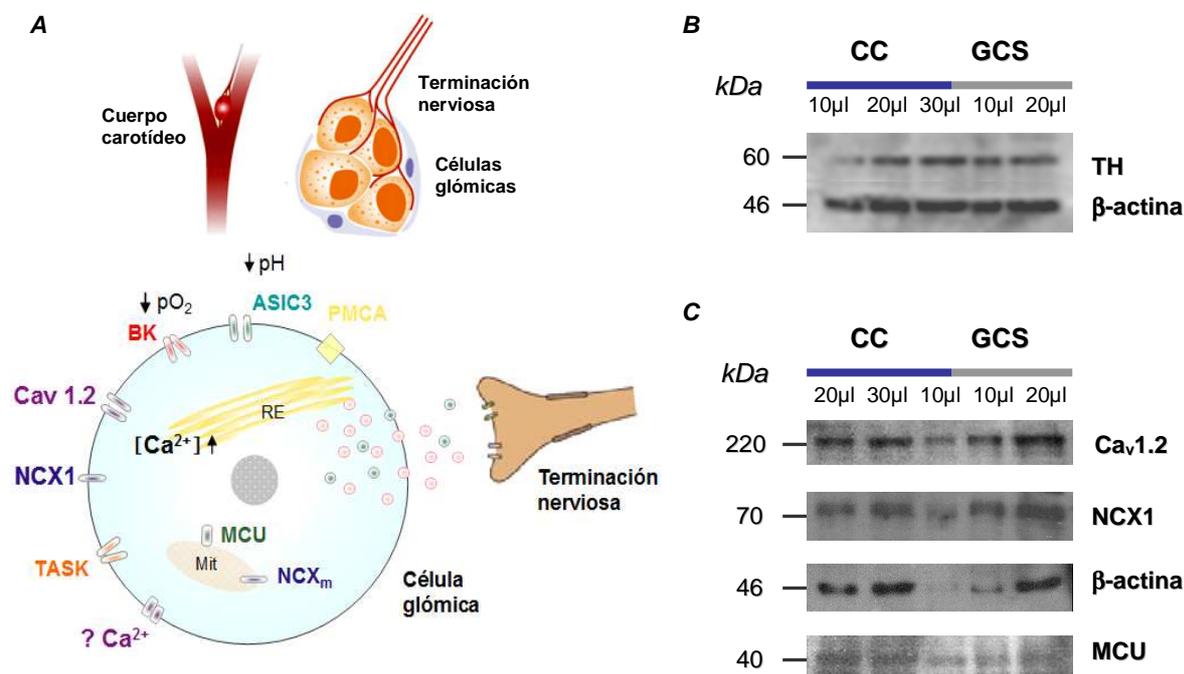


Figura 11. Western blot representativos de las proteínas NCX, Cav1.2 y MCU en CC y GCS de rata. A. Esquema representativo que muestra una célula de tipo I de CC de rata con canales de K⁺ (TASK, ASIC3, BK) y varios mecanismos involucrados en la homeostasis del calcio ($Ca_v1.2$, NCX, MCU) relacionados con la liberación de neurotransmisores, mediada por el incremento de calcio intracelular. **B.** Western blot de TH como marcador de CQ y β -actina como control endógeno. **C.** Western blot representativo de $Ca_v1.2$, NCX, MCU en CC y CGS con β -actina como control de carga.

4.4.2. Localización de NCX y otras proteínas mediante inmunocitoquímica

Una vez demostrada la presencia de $Ca_v1.2$, NCX y MCU a nivel de proteína en homogenizados de CC intacto, queda verificar si éstas se encuentran en las CQ, dada la heterogeneidad celular de dicho órgano. Con este objetivo, analizamos la posible co-localización de estas proteínas con TH mediante técnicas inmunocitoquímicas. Antes de esto, hemos caracterizado inmunocitoquímicamente los dos tipos celulares del CC de rata utilizando marcadores de cada linaje celular.

En la **figura 12** se muestran las imágenes obtenidas por fluorescencia de una disociación típica de un cultivo de CC de 24 h con anticuerpos anti-TH y anti-GFAP identificando las células tipo I o CQ y las células tipo II o sustentaculares, respectivamente, en un cultivo heterogéneo que contiene además otros tipos celulares como demuestra el marcaje de núcleos con DAPI. Las imágenes de la **figura 12B** muestran la abundancia de las células tipo I o CQ frente al total de células en cultivo de CC, llegando a superar el 50%. Aunque no hemos medido la proporción de células tipo I a células tipo II, está descrito en la bibliografía que es de 4:1 (Piskuric y Nurse, 2012). La **figura 12C** muestra imágenes de un cultivo poco disociado en el que se pueden apreciar glomoides. La **figura 12D** muestra un zoom del recuadro señalado en C. Las imágenes de inmunofluorescencia mostradas son representativas de al menos 4 experimentos, con resultados muy similares.

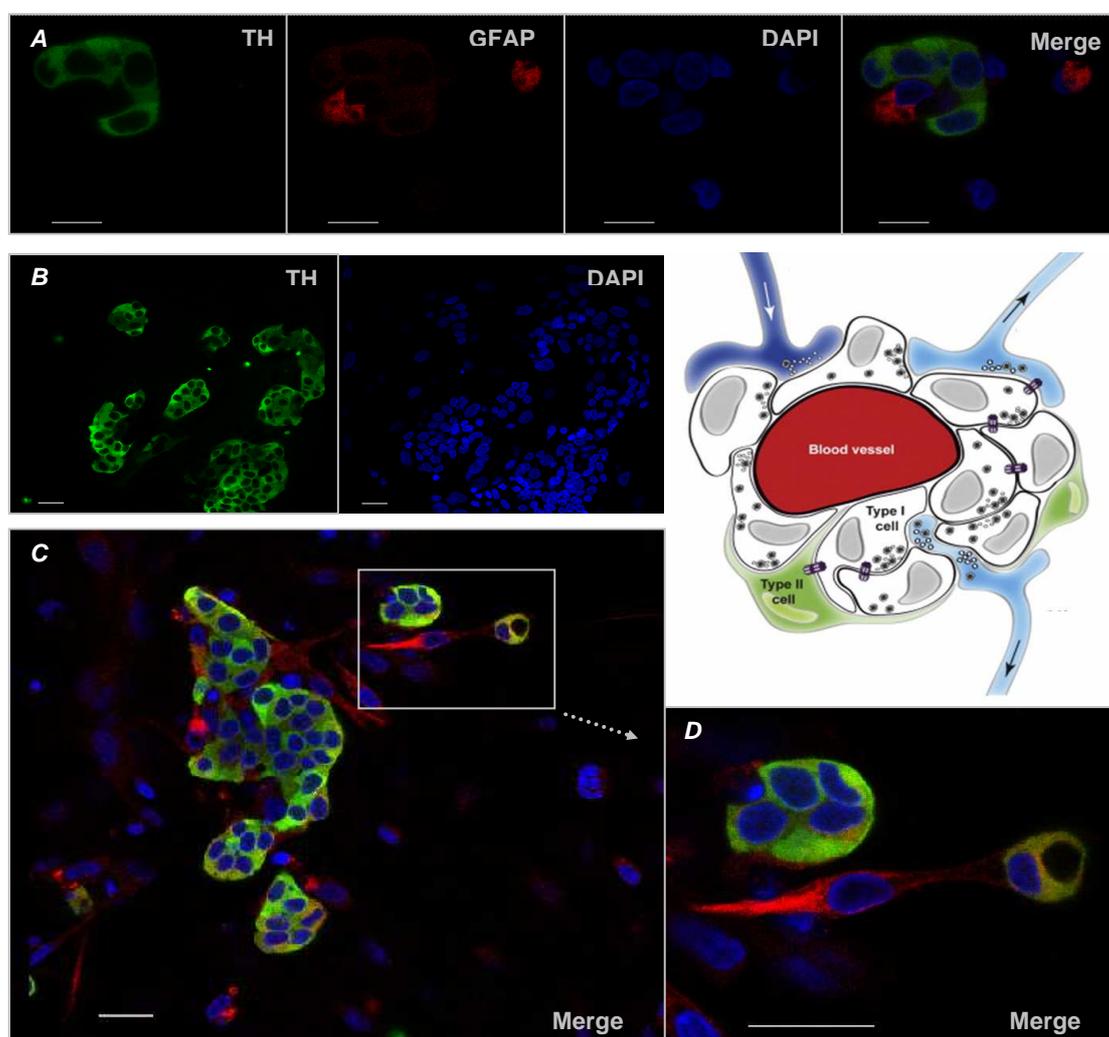


Figura 12. Identificación de tipos celulares de CC mediante inmunofluorescencia confocal en un cultivo celular de 24 h. **A.** Identificación de células de CC junto con los núcleos teñidos con DAPI: CQ (TH, verde) y sustentaculares (GFAP, rojo); a la derecha, superposición de ambas proteínas junto con la tinción de núcleos. **B.** Localización y relación de CQ del total de células del campo visual: nótese que las células TH-positivas son más abundantes en el cultivo de CC. **C.** Sección confocal mostrando clusters inmunopositivos para tirosina hidroxilasa (TH, verde) y células tipo II, inmunopositivas para proteína fibrilar ácida glial (GFAP, rojo); **D.** La inserción en C mostrada en alta magnificación. La incubación sin anticuerpo primario no dio señal (datos no mostrados). Barras de escala, 10 μ m en A; 20 μ m en B-D.

Una vez caracterizada nuestra preparación mediante fluorescencia, analizamos si el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1), los canales L ($\text{Ca}_v1.2$) y el uniportador mitocondrial (MCU) se expresan en las células glómicas del CC o en otro tipo celular mediante inmunocitoquímica con doble marcaje para TH y las proteínas mencionadas.

En la **figura 13** se muestran fotografías tomadas de tres campos seleccionados (A, B y C) expuestos a la luz de longitud de onda adecuada para poner de manifiesto los colorantes: FITC, verde, dirigido a anticuerpos primarios monoclonales (TH en el caso de las imágenes B y C y NCX en A), rojo Alexa 594, para los policlonales (TH, $\text{Ca}_v1.2$ y MCU en las imágenes A, B y C, respectivamente) y DAPI (azul), para los núcleos. En las imágenes de marcaje para TH puede contemplarse cómo se tiñe el citoplasma de algunas células (CQ o tipo I), que es donde se encuentra este enzima. En las inmunotinciones para NCX, $\text{Ca}_v1.2$ y MCU observamos en general una mayor población de células marcadas que de TH positivas. En la última imagen de cada panel, aparecen superpuestas las anteriores. Se aprecia que hay células positivas a TH, otras que lo son a las proteínas objeto de estudio (mayoritarias), otras que son positivas a las dos y muy pocas a ninguna.

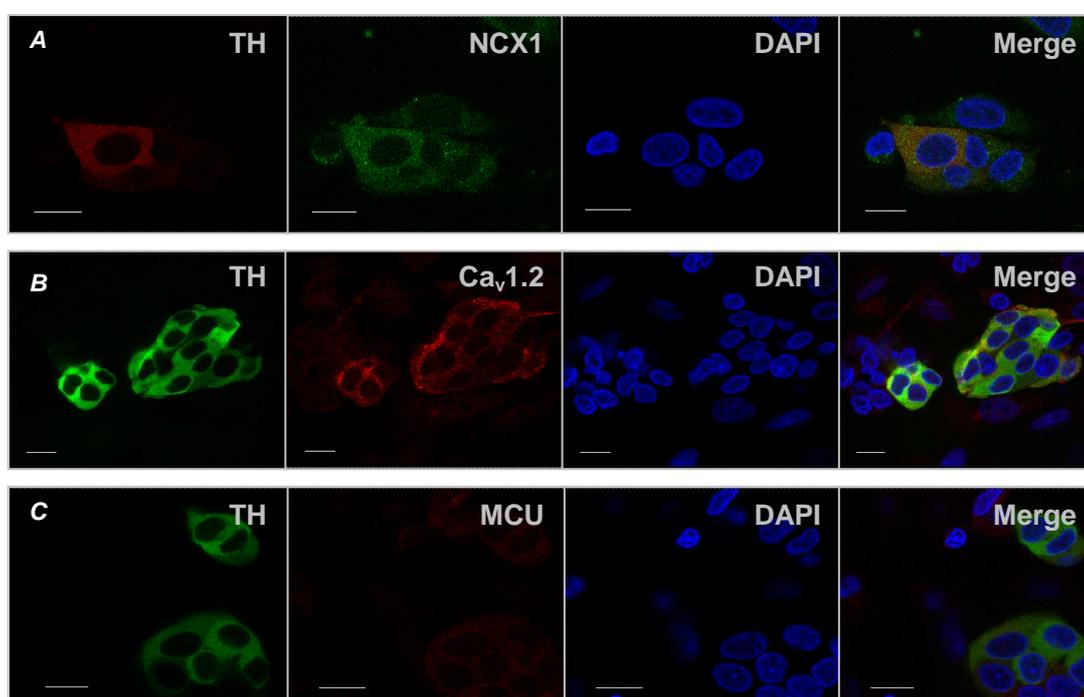


Figura 13. Localización de proteínas responsables de distintos mecanismos de entrada de Ca^{2+} , mediante inmunofluorescencia, en células cultivadas de CC. A-C. Tres cultivos celulares obtenidos de CC de rata que muestran doble tinción revelando la co-localización del intercambiador NCX, los canales $\text{Ca}_v1.2$ y el uniportador mitocondrial MCU, en A, B y C respectivamente, junto con el marcador de CQ, TH. La incubación sin anticuerpo primario no dio señal (datos no mostrados). Barras de escala, 10 μm .

4.5. POSIBLE PAPEL MITOCONDRIAL EN LA HOMEOSTASIS DE Ca^{2+} DE LAS CQ

Los últimos experimentos realizados, y de forma muy preliminar por falta de tiempo, fueron encaminados a determinar un posible papel de la mitocondria en la homeostasis del Ca^{2+} en las CQ de CC de rata teniendo en cuenta el papel amortiguador de este orgánulo. Iniciamos el estudio utilizando el protonóforo FCCP (carbonilcianida-p-trifluorometoxifenil hidrazona), un compuesto que disipa el gradiente de protones de la mitocondria, provocando su despolarización y en consecuencia bloqueando la captación de Ca^{2+} por la mitocondria (Montero *et al.*, 2000; Villalobos *et al.*, 2002).

Como se observa en la **figura 14A**, las células cargadas con Fura-2-AM y tratadas con 1 mM de FCCP, incrementaron considerablemente su $[Ca^{2+}]_i$, viéndose afectado este efecto por la perfusión adicional de solución libre de Na^+ . En cuanto a la secreción de CA inducida por la acción del FCCP, ocurre lo mismo que en los experimentos de medida de Ca^{2+} en célula única, tanto en su aplicación individual, aumentando drásticamente la secreción, como en su aplicación conjunta con 0mM de Na^+ , produciendo un efecto inhibitorio (**Fig. 14B**). Tras la eliminación del FCCP se produce un efecto rebote, que por producirse en 0 Na^+ se corresponde con un aumento de Ca^{2+} inducido por el funcionamiento del NCX_{REV} . La **figura 14C** muestra cómo el Ni^{2+} revierte completamente el efecto del FCCP. Esta reversión podría ser debida a la inhibición del NCX o a la inhibición de canales de calcio voltaje dependientes. Aunque estos resultados no son concluyentes dejan una vía abierta para continuar con el tema.

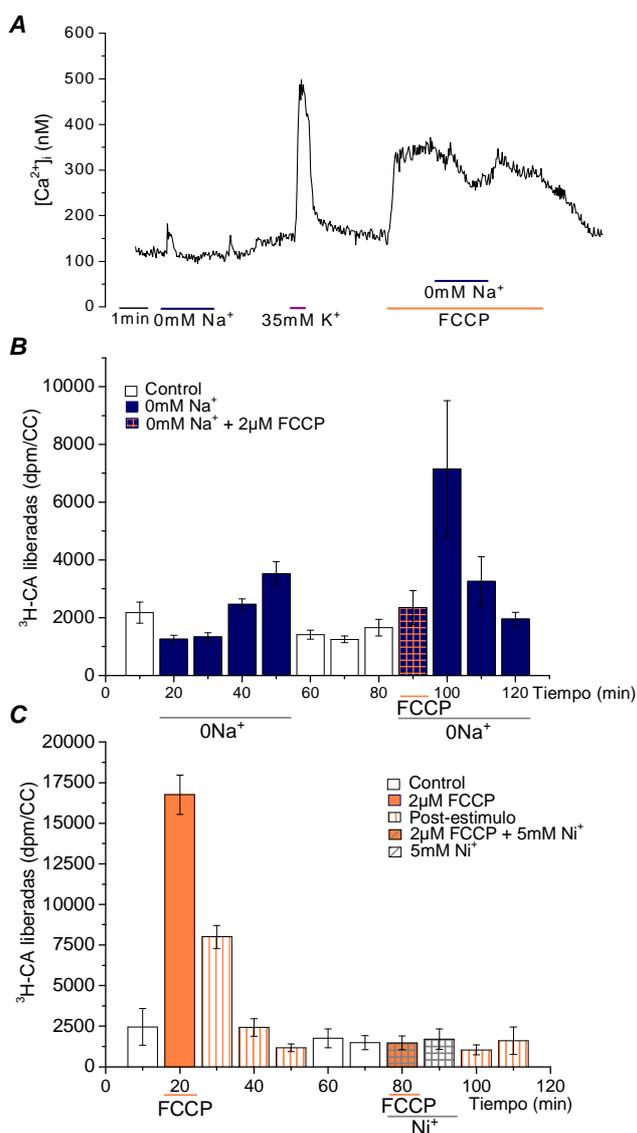


Figura 14. Efecto del desacoplante mitocondrial FCCP en las CQ de CC y de la acción del intercambiador Na^+/Ca^{2+} funcionando en modo reverso. A. Efecto del FCCP 1 mM y FCCP + 0 Na^+ sobre la $[Ca^{2+}]_i$. **B.** Efecto del FCCP sobre liberación de CA inducidas por 0 Na^+ . **C.** Efecto del FCCP sobre respuesta secretora y su inhibición por la adición de Ni^{2+} (bloqueante inespecífico de canales Ca^{2+} y NCX). Los datos son medias \pm SEM de 4 CC.

5. DISCUSIÓN

El Ca^{2+} es utilizado como una señal intracelular para el control de múltiples procesos celulares, entre los que se encuentra la secreción de neurotransmisores. Este trabajo ha tenido como objetivo el estudio del papel del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática en la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} de las células quimiorreceptoras de CC de rata, prestando especial atención a su posible participación en el proceso de la transducción hipóxica que conlleva, en último término, la secreción de neurotransmisores. Las principales técnicas experimentales empleadas para llevarlo a cabo han sido dos: los registros de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante imagen de Ca^{2+} en célula única usando el indicador fluorescente Fura-2 y la medida de la liberación de catecolaminas por método radiométrico (marcado de depósitos en forma de $^3\text{H-CA}$), como índice de su actividad quimiorreceptora, teniendo en cuenta que las CA son los neurotransmisores más abundantes en estas células (Gonzalez et al., 1994).

En primer lugar hemos validado el método de registro de Ca^{2+} utilizado por el grupo de "Homeostasis de calcio subcelular" del IBGM para la medida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las CQ de CC de rata. La mayor dificultad ha residido en obtener cada día cultivos celulares frescos a partir de la cirugía y extracción de CC de rata, su disociación y su cultivo durante 24 horas, con el reto de obtener cultivos con células viables y con la mínima variabilidad. Otra dificultad añadida es que al ser un cultivo primario heterogéneo, debíamos identificar y seleccionar en cada experimento las células de nuestro interés. Aunque presentes en menor número, las células tipo II están en íntima asociación con las células tipo I y aunque éstas no son excitables también generan respuestas de calcio con los estímulos apropiados. Por ello hemos caracterizado nuestro cultivo celular demostrando la presencia de las diferentes células y su respuesta a diferentes estímulos. De todos los estímulos probados, con el que mayor dificultad nos hemos encontrado ha sido con la hipoxia. Esto ha sido debido fundamentalmente a que ni la camarita ni las vías de perfusión del equipo de registro de calcio utilizado eran las más idóneas para mantener el nivel de hipoxia. Ello nos ha obligado a utilizar 95% N_2 o incluso hipoxia química con ditionita para obtener hipoxias comparables al 5% O_2 utilizado en CC entero en el baño de incubación.

Mediante inmunocitoquímica hemos marcado específicamente las CQ con un anticuerpo anti-TH y las células tipo II (gliales) con anti-GFAP encontrando que más del 50% eran tipo I, según nuestro método de disociación. En la literatura se describe una relación aproximada de 1 célula tipo II por cada 4 de tipo I (Piskuric & Nurse, 2012) teniendo en cuenta además la existencia de otros tipos celulares (fibroblastos, endoteliales, etc). En cuanto a la respuesta a diferentes estímulos, hemos podido apreciar que a la estimulación con alto K^+ , hipoxia y hipercapnia ácida responde un mismo tipo celular excitable, que identificamos como tipo I, (quimiorreceptores) y al ATP, pero no al alto K^+ ni a la hipoxia, responde otro tipo, identificado como tipo II. Se ha descrito que el ATP moviliza calcio en dichas células, pero no en las tipo I, a través de receptores purinérgicos P2Y2 (Xu et al., 2003).

En una primera fase de experimentos hemos procedido a demostrar la existencia y la capacidad de transporte del NCX en las CQ forzando su activación en modo reverso, eliminando el Na^+ extracelular. Como ya hemos comentado, la actividad del NCX está afectada por la concentración intracelular y extracelular de los iones que transporta, tanto el Ca^{2+} como el Na^+ y por el potencial de membrana al ser un transportador electrogénico. La eliminación de Na_e debería, por tanto, favorecer la entrada de Ca^{2+} por el modo inverso o disminuir su salida por el modo directo, produciéndose una acumulación intracelular de Ca^{2+} y un aumento de la secreción de CA por parte de las CQ. Efectivamente, esto es lo que sucede en nuestras células. Además dicho efecto es sensible a inhibidores del NCX, como el Ni^{2+} o el específico del NCX_{REV} el KB-R7943, lo que pone de manifiesto que el aumento del Ca^{2+}_i está mediado por el intercambiador. Debido a que el Ni^{2+} a la dosis utilizada (5 mM) inhibe también canales de calcio voltaje dependientes (VOCCs), y como los canales tipo L constituyen la principal vía de entrada de Ca^{2+} estimulada en las CQ, hemos comprobado si el efecto de la eliminación del Na_e era producido por despolarización. El nifedipino, un inhibidor específico de canales de Ca^{2+} , perteneciente a la familia de las dihidropiridinas, no afectó al incremento de Ca^{2+} inducida por 0 Na^+ extracelular. Por el contrario, el nifedipino eliminó totalmente las oscilaciones de calcio que se apreciaron tras la estimulación de algunas células lo que pone de manifiesto que dichas oscilaciones son debidas a la activación de canales tipo L.

Respecto al KB-R7943 apreciamos un doble comportamiento sobre el efecto inducido por la eliminación de Na^+ : inhibitorio sobre el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y potenciador sobre la respuesta secretora. Este resultado puede deberse a varios efectos inespecíficos descritos por otros autores: inhibición de transportadores mitocondriales tales como el MCU y el NCX_{MIT} (Santo-Domingo, 2007), bloqueo del receptor nicotínico de acetilcolina (Pintado *et al.*, 2000) e inhibición de canales de Ca^{2+} , K^+ y Na^+ (Matsuda

et al., 2001). Como hemos comentado en la Introducción, existen otros inhibidores nuevos del NCX_{REV}, tales como el SEA0400 y el SN-6 (Kita *et al.*, 2007), más específicos, pero que no hemos podido utilizar por no disponer de ellos en el momento de la realización de este trabajo. Un segundo aspecto a considerar sobre el KB-R7943 es que aunque ha sido descrito como inhibidor del NCX solo cuando opera en forma reversa, en nuestros experimentos hemos observado que cuando inhibe al NCX lo hace en ambos modos, directo y reverso.

En relación con el segundo objetivo, hemos estudiado la implicación del NCX operando en modo reverso y el efecto de su inhibición por el compuesto KB-R7943, sobre dos estímulos: alto K⁺ (35mM) e hipoxia. La respuesta del Ca²⁺ y la liberación de CA inducida por alto K⁺ extracelular fueron mayores en ausencia de Na⁺ que en presencia de Na⁺ normal. Una interpretación de este hallazgo es que el NCX esté contribuyendo a la entrada adicional de Ca²⁺ por inversión del gradiente de Na⁺ y por la propia despolarización, como hemos comentado que sucede en cardiomiocitos durante la despolarización del potencial de acción. Alternativamente o adicionalmente podría deberse a la acumulación de Ca²⁺ debido al bloqueo de la salida de Ca²⁺ por ausencia de Na⁺ para su intercambio. Sin embargo, el hecho de que el KB-R7943 tenga un efecto inhibitorio sobre el mismo estímulo aboga por la primera de las interpretaciones.

Al contrario de lo que sucede con el alto K⁺, tanto la respuesta de calcio como la secretora inducida por la hipoxia desaparece en ausencia de Na⁺. Aunque en el caso de la secreción lo que se observa en realidad es una respuesta atenuada a la hipoxia tras la eliminación de Na⁺, el patrón de liberación es muy similar al obtenido solo con 0Na, aplicado en paralelo a otros CC. Por ello se puede interpretar que la respuesta a la hipoxia en ausencia de Na⁺ se debe al propio efecto de eliminar el Na⁺ y no a la hipoxia. Esto se confirma cuando expresamos la liberación evocada por la hipoxia, por el 0Na⁺ o por 0Na⁺ + hipoxia como el cociente de la liberación del S2 respecto al primer ciclo de estimulación (S1) en que se aplica hipoxia en Na⁺ normal a los tres grupos. El análisis revela que el cociente de liberación evocada S2/S1 es idéntico para la hipoxia en 0 Na⁺ y para el 0 Na⁺ solo (≈ 0.5), mucho menor que para dos ciclos de hipoxia en Na⁺ normal (0.8). La falta de respuesta a la hipoxia en 0Na⁺ se puede interpretar teniendo en cuenta la existencia de una conductancia *background* de Na⁺ en las células tipo I descrita por el grupo de Peers (Carpenter y Peer, 2001). Esta corriente proporciona un efecto despolarizante continuado en dichas células desplazando el potencial de membrana y facilitando la activación de la célula. Al eliminar el Na⁺ extracelular se produciría un efecto hiperpolarizante que impediría que al aplicar la hipoxia se activen suficientes canales de calcio dependientes de voltaje.

Respecto al efecto del KB-R7943, éste no afecta la liberación por hipoxia aunque retarda la recuperación de la concentración de Ca²⁺ basal post-estímulo, efecto que se observa también tras la estimulación con alto K⁺. Esto pone de manifiesto el papel fundamental del NCX en la homeostasis del Ca, balanceando la entrada de Ca²⁺ que se produce por los canales de calcio.

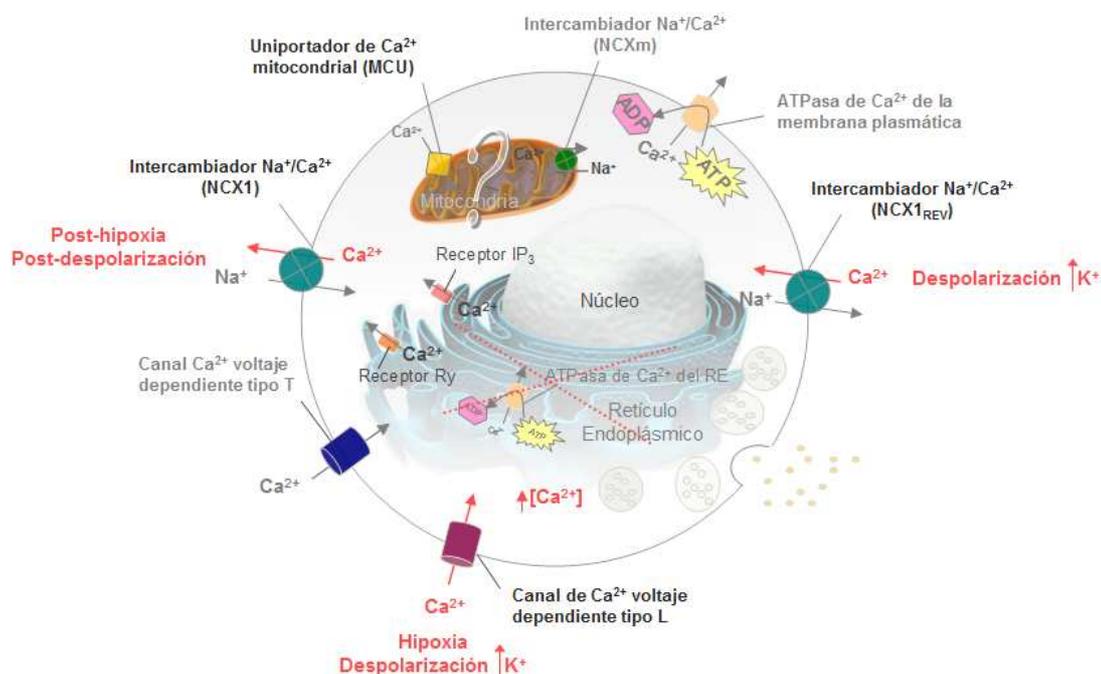
Por último nos quedaría discutir qué isoforma del NCX se expresa en el CC. Mediante western blot encontramos que al menos la NCX1 está presente. Las otras dos isoformas (NCX2 y NCX3) no han sido analizadas por carecer de los anticuerpos correspondientes. Sorprende que el anticuerpo monoclonal anti-NCX1 utilizado detecte una banda que no corresponde con el peso molecular esperado (110kDa). Como ya he comentado la banda de 70kDa que aparece en el gel, correspondería a la forma corta de NCX1, que es o bien un producto proteolíticamente escindido o una forma funcional incompleta de NCX1 (Zhang *et al.*, 2005). No descartamos que el anticuerpo anti-NCX1 este reconociendo otra isoforma de la familia de intercambiadores de Na⁺/Ca²⁺ de menor peso molecular, como el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ mitocondrial, que intercambia indistintamente Na⁺ o Li⁺ por Ca²⁺ (NCLX, 70kDa; Palty *et al.* 2010), ya que no disponemos de información suficiente por la casa comercial para descartar dicha inespecificidad del anticuerpo. Mediante inmunocitoquímica hemos comprobado que el NCX1 que detectamos por Western Blot co-localiza con TH, marcador de las CQ.

Del mismo modo hemos comprobado la expresión de otras proteínas implicadas en la homeostasis de Ca²⁺ como son los canales de Ca²⁺ tipo L (Ca_v1.2) y el uniportador de calcio mitocondrial (MCU). Aunque la presencia de canales de Ca²⁺ tipo L en el CC es indiscutible desde el punto de vista electrofisiológico, farmacológico y molecular, queremos señalar que hasta la fecha no se habían mostrado en Western blot; la presencia del uniportador mitocondrial se describe por primera vez en las CQ del CC de rata.

Por último y de una manera muy breve por disponer de muy pocos datos, queremos discutir los resultados preliminares sobre la implicación de la mitocondria en la homeostasis de Ca²⁺ en células

quimiorreceptoras y su participación en la respuesta secretora de CA. Existen muchas referencias mostrando que la mitocondria puede ser un importante depósito dinámico de Ca^{2+} en muchos tipos celulares (Montero et al. 2000; Montero et al., 2001). Por otro lado en un artículo muy reciente Buckler propone que la mitocondria puede ser el elemento sensor de la hipoxia en el CC, por su especial sensibilidad a pequeños cambios de la PO_2 gracias a una citocromo oxidasa de baja afinidad al oxígeno en el complejo IV (Buckler & Turner, 2013). Ello nos ha llevado a realizar una serie de experimentos preliminares para examinar el papel de la mitocondria. En concreto, hemos probado el efecto del desacoplante mitocondrial FCCP, que podría producir acumulación de Ca^{2+}_i si la mitocondria actuara de depósito (a través del uniportador MCU) o eliminar la respuesta a la hipoxia si actuara de sensor. El resultado encontrado es que el FCCP *per se* genera un pico importante de Ca_i , compatible con la despolarización mitocondrial. Dicho efecto ha sido descrito previamente como mediado por la despolarización de la membrana plasmática a través de inhibición de corrientes *background* de K, la apertura de VOCC y la entrada masiva de iones Ca^{2+} y Na^+ (Buckler & Vaughan-Jones, 1998). Hemos comprobado que el efecto es sensible a Ni^{2+} y dependiente de Na^+ extracelular. Al eliminar el Na^+ la despolarización es menor y como consecuencia la entrada de Ca^{2+} estimulada por el FCCP disminuye. Lo mismo sucede sobre la respuesta secretora. Respecto al efecto del FCCP sobre la hipoxia no hemos podido probarlo ya que el FCCP genera una respuesta mayor que la propia hipoxia.

Para finalizar la discusión e interpretación de los datos recogidos en este trabajo, mostramos el siguiente modelo de homeostasis de Ca^{2+} en CQ de rata.



La respuesta de las CQ del CC a la hipoxia liberando NT involucra la modulación de Ca^{2+}_i a través del balance de su entrada y salida del citosol. La entrada sucede principalmente a través de canales voltaje dependientes de tipo L. Aunque existen otros VOCCs en CC de rata, como los T y los N, su contribución en la regulación del Ca^{2+}_i y en la exocitosis es claramente menor (Cayzac *et al.*, 2009; Cáceres *et al.*, 2009). Los mecanismos de salida de calcio balancean dicha entrada y determinan en último término el curso temporal de recuperación de los niveles basales y por tanto de la secreción de NT. Entre estos mecanismos se encuentran la ATPasa de la membrana plasmática, de menor contribución (Conde *et al.*, 2006) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ juega un papel importante en esta recuperación, y además por ser reversible puede contribuir a la entrada de calcio, funcionando en modo reverso cuando la célula se despolariza, como hemos demostrado. La contribución del RE como reservorio de Ca^{2+} parece más bien escasa al menos en la función secretora (Conde *et al.*, 2006). Referente al comportamiento de la mitocondria en la homeostasis de Ca^{2+} desconocemos su implicación hasta el momento, debido a que los experimentos realizados son muy preliminares.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de este trabajo, formulamos las siguientes conclusiones:

1. Las células quimiorreceptoras de cuerpo carotídeo de rata poseen un activo intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su membrana plasmática puesto en evidencia mediante la eliminación de Na^+ extracelular: la superfusión con 0Na^+ activa la entrada de Ca^{2+} debido a la reversión del NCX promoviendo una respuesta secretora.
2. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la eliminación de Na^+ extracelular es debido a la activación del NCX ya que es sensible a los inhibidores del NCX_{REV} (Ni^{2+} y KB-R7943) e insensible a nifedipino. Se descarta pues que la entrada de Ca^{2+} este mediada por despolarización y apertura de VOCCs tipo L.
3. El KB-R7943 en CQ de CC muestra efectos inespecíficos, ya que su acción inhibitoria sobre el Ca^{2+}_i no se correlaciona con su efecto potenciador de la respuesta secretora. Efectos inespecíficos de este compuesto han sido descritos en otras preparaciones.
4. Mediante Western Blot e inmunocitoquímica demostramos la expresión de al menos la isoforma NCX1 del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en células quimiorreceptoras de CC de rata al igual que comprobamos la expresión de canales de calcio tipo $\text{Ca}_v1.2$ y el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial.
5. En cuanto al papel funcional del NCX en la respuesta de las CQ a la hipoxia, constatamos que la eliminación de Na^+ suprime la respuesta a la hipoxia. Se mantiene una respuesta residual que coincide con la propia respuesta a 0Na^+ . Esto pudiera ser debido a un efecto hiperpolarizante de la eliminación del Na^+ .
6. La activación del NCX_{REV} potencia el aumento de Ca^{2+}_i y la liberación de CA inducido por despolarización con alto K^+ extracelular. Este efecto parece ser debido al aumento de la entrada de Ca^{2+} por NCX_{REV} , como se observa tras su inhibición por KB-R7943.
7. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ participa en la recuperación de los niveles basales de Ca^{2+}_i ya que su inhibición por KB-R7943 mantiene elevada la secreción de CA tras la estimulación de las CQ por despolarización e hipoxia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Altimimi HF., Schnetkamp PP. 2007. Na⁺/Ca²⁺-K⁺ exchangers (NCKX): functional properties and physiological roles. *Channels (Austin)* 1(2):62-9.
- Annunziato L., Pignataro G., Di Renzo GF. 2004. Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol. Rev.* 56:633-654.
- Berridge MJ. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361(6410):315-325.
- Berridge MJ., Bootman MD., Roderick HL. 2003. Ca²⁺ signaling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:517-529.
- Buckler KJ., Turner PJ. 2013. Oxygen sensitivity of mitochondrial function in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol.* 591:3549-63.
- Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. 1998. Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. *J Physiol* 513:819-833.
- Burgess TL., Kelly RB. 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:243-293.
- Cáceres AI., González-Obeso E., González C., Rocher A. 2009. RT-PCR and pharmacological analysis of L- and T-type calcium channels in rat carotid body. *Arterial Chemoreception. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Ed. C. González) Springer, pp. 105-112.
- Carafoli E. 2003. The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:326-332.
- Carpenter E. y Peers C. 2001. A standing Na⁺ conductance in rat carotid body type I cells.
- Catterall WA. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-555.
- Cayzac S., Rocher A., Obeso A., González C., Kenp PJ., Riccardi D. 2009. Effects of the polyamine spermine on arterial chemoreception. *Arterial Chemoreception. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Ed. PJ. Kemp) Springer, pp. 97-104.
- Chamero P., Villalobos C., Alonso MT., Garcia-Sancho J. 2002. Dampening of cytosolic Ca²⁺ oscillations on propagation to nucleus. *J. Biol. Chem.* 277(52):50226-50229.
- Conde SV., Cáceres AI., Vicario I., Rocher A., Obeso A., Gonzalez C. 2006. An overview on the homeostasis of Ca²⁺ in chemoreceptor cells of the rabbit and rat carotid bodies. *The Arterial Chemoreceptors* (Ed. Y. Hayashida *et al.*) Springer, pp. 215-222.
- Douglas WW. 1968. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34:451-474.
- Fearon IM., Zhang M., Vollmer C-, Nurse CA. 2003. GABA mediates autoreceptor feedback inhibition in the rat carotid body via presynaptic GABAB receptors and TASK-1. GABA mediates autoreceptor feedback inhibition in the rat carotid body via presynaptic GABAB receptors and TASK-1. *J. Physiol.* 553:83-94.
- Fidone S., González C. 1982. Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *J. Physiol.* 333:69-79.
- Franco-Obregon A., Ureña J., López-Barneo J. 1995. Oxygen-sensitive calcium channels in vascular smooth muscle and their possible role in hypoxic arterial relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4715-4719.
- González C., Almaraz L., Obeso A., Rigual R. 1994. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol. Rev.* 74:829-898.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
- Hryshko LV., Nicoll DA., Weiss JN., Philipson KD. 1993. Biosíntesis and inicial processing of the cardiac sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Biochim. Biophys. Acta.* 1151(1):35-42.

- Iwamoto T. 2004. Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchange studies: Molecular pharmacology of Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors. *J. Pharmacol. Sci.* 96:27-32.
- Iwamoto T. 2007. Na⁺/Ca²⁺ Exchange as a Drug Target-Insights from Molecular Pharmacology and Genetic Engineering. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1099:516-528.
- Kelly RB. 1985. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230:25-32.
- Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham DE. 2004. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427(6972):360-4.
- Kita S., Iwamoto T. 2007. Inhibitory mechanism of SN-6, a novel benzyloxyphenyl Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1099:529-533.
- Li J., Doyle KM., Tatlisumak T. 2007. Polyamines in the brain: distribution, biological interactions, and their potential therapeutic role in brain ischaemia. *Curr. Med. Chem.* 14:1807-13.
- Lipp P., Niggli E. 1994. Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 474(3):439-46.
- López-Barneo J., Ortega-Saenz P., Pardal R., Pascual A., Piruat JI. 2008. Carotid body oxygen sensing. *Eur. Respir. J.* 32:1386-1398.
- López-López JR., González C., Pérez-García MT. 1997. Properties of ionic currents from isolated adult rat carotid body chemoreceptor cells: effect of hypoxia. *J. Physiol.* 499:429-441.
- Malli R., Graier WF. 2010. Mitochondrial Ca²⁺ channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett* 584(10):1942-7.
- Masuko T., Kusama-Eguchi K., Sakata K., Kusama T., Chaki S., Okuyama S., Williams K., Kashiwagi K., Igarashi K. 2003. Polyamine transport, accumulation, and release in brain. *J. Neurochem.* 84:610-7.
- Matsuda T., Arakawa N., Takuma K. 2001. SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp. Ther.* 298:249-256.
- Montero M., Alonso MT., Carnicero E., Cuchillo-Ibanez I., Albillos A., Garcia AG., Garcia-Sancho J., Alvarez J. 2000. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat. Cell. Biol.* 2(2):57-61.
- Montero M., Alonso MT., Albillos A, García-Sancho J, Alvarez J. 2001. Mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release mediated by the Ca²⁺ uniporter. *Mol. Biol. Cell.* 12(1):63-71.
- Obeso A., Rocher A., Fidone S., González C. 1992. The role of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels in stimulus-evoked catecholamine release from chemoreceptor cells of the carotid body. *Neuroscience* 47:463-472.
- Palty R., Silverman WF., Hershinkel M., Caporale T., Sensi SL., Parnis J., Nolte C., Fishman D., Shoshan-Barmatz V., Hermann S., Khananshvili D., Sekler I. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Prot. Nac. Acc. Sci. USA* 107:436-441.
- Pearse AGE., Polak JM., Rost FWD., Fontaine J., Le Lièvre C., Le Douarin N. 1973. Demonstration of the Neural (APUD) cells in the avian carotid body using a cytochemical marker system. *Histochemistry* 34:191-203.
- Pintado AJ., Herrero CJ., García AG., Montiel C. 2000. The novel Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 also blocks native and expressed neuronal nicotinic receptors. *Br. J. Pharmacol.* 130:1893-1902.
- Piskuric NA., Nurse CA. 2013. Effects of chemostimuli on [Ca²⁺]_i responses of rat aortic body type I cells and endogenous local neurons: comparison with carotid body cells. *J. Physiol.* pp. 2121-2135
- Putney JW. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7(1):1-12.
- Rocher A., González C., Almaraz L. 1999. Adenosine inhibits L-type Ca²⁺ current and catecholamine release in the rabbit carotid body chemoreceptor cells. *Eur. J. Neurosci* 11:673-681.

- Rocher A., Geijo-Barrientos E., Cáceres Al., Rigual R., González C., Almaraz L. 2005. Role of voltage-dependent calcium channel in stimulus-secretion coupling in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *J. Physiol.* 562:407-420.
- Salido GM., Jardín I., Rosado JA. 2011. The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 704:413-33.
- Santo-Domingo J., Vay L., Alvarez J. 2007. The plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter. *Br. J. Pharmacol.* 647-654.
- Saris NE., Carafoli E. 2005. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochem. (Mosc).* 70(2):187-94.
- Sasaki N., Dayanithi G., Shibuya I. 2005. Ca²⁺ clearance mechanisms in neurohypophysial terminals of the rat. *Cell Calcium.* 37:45-56.
- Tanaka H., Nishimaru K., Aikawa T., Hirayama W., Tanaka Y., Shigenobu K. 2002. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br. J. Pharmacol.* 135:1096-1100.
- Ureña J., Fernández-Chacón R., Benot AR., Alvarez de Toledo GA., López-Barneo J. 1994. Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10208-10211.
- Verna A. 1997. The mammalian carotid body: Morphological data. *The Carotid Body Chemoreceptors.* (Ed. C.González) Springer. pp. 1-30.
- Vicario I, Obeso A, Rocher A, Lopez-lopez JR and Gonzalez C. 2000. Intracellular Ca²⁺ stores in chemoreceptor cells of the rabbit carotid body: significance for chemoreception. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279:C51-61.
- Villalobos C., García-Sancho J. 1995. Capacitative Ca²⁺ entry contributes to the Ca²⁺ influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH3 pituitary cells. *Pflugers Arch.* 430(6):923-35.
- Villalobos C., Nuñez L., Montero M., García AG., Alonso MT., Chamero P., Alvarez J., García-Sancho J. 2002. Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J.* 16(3):343-53.
- Watanabe Y., Koide Y., Kimura J. 2006. Topics on the Na⁺/Ca²⁺ exchanger: pharmacological characterization of Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibitors. *J. Pharmacol. Sci.* 102:7-16.
- Wyatt CN, Wright C, Bee D, Peers C. 1995. O₂ sensitive K currents in carotid body chemoreceptor cells from normoxic and chronically hypoxic rats and their roles in hypoxic chemotransduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 295-299.
- Xu J, Tse FW, Tse A. 2003. ATP triggers intracellular Ca release in type II cells of the rat carotid body. *J. Physiol.* 549:739-47.
- Zhang S., Yuan JX., Barrett KE., Dong H. 2005. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in regulating cytosolic Ca²⁺ in cultured human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 288:C245-C252.
- Zucker RS. 1996. Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17:1049-1055.