



ELECTROFISIOLOGIA DE CELULAS ADRENOCORTICALES:  
ESTUDIO MEDIANTE EL REGISTRO INTRACELULAR  
Y LA TECNICA DE "PATCH CLAMP"

Lucía Tabares Dominguez



Tesis presentada para optar al grado de Doctor por  
la Facultad de Medicina de Sevilla

Sevilla, 1985

R. M. 477



AVDA. SANCHEZ PIJUAN, 4

41009 - SEVILLA

TELÉFONO (954) 37 15 48

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA  
FACULTAD DE MEDICINA

Don José López Barneo, Profesor Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que Doña Lucía Tabares Domínguez, ha realizado bajo su dirección el trabajo sobre "Electrofisiología de células adrenocorticales: estudio mediante el registro intracelular y la técnica de patch-clamp", que presenta para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Facultad de Medicina de Sevilla.



Fdo. José López Barneo

Sevilla a 16 de diciembre de 1985



Durante el periodo de tiempo que ha durado este trabajo he aprendido a pensar, leer y trabajar desde el punto de vista científico. Todo lo que sé ahora se lo debo a José López Barneo, el cual me ha dedicado mucho de su tiempo y contagiado su entusiasmo científico. Así mismo quiero expresar mi gratitud a Diego Mir Jordano, quién me influyó decisivamente para dedicar mis horas a la Fisiología y el que me alienta con su ejemplo diario. Al resto de los miembros del Departamento de Fisiología les agradezco su ayuda y compañía y he de citar las colaboraciones directas de Juan José Toledo, Diego Sanchez y Rafael Montoro. Finalmente, expreso mi gratitud al Departamento de Microbiología, y en particular a Constantino de Miguel quién me ha iniciado en las técnicas de cultivo celular y ha participado diariamente en la realización de los experimentos. Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la CAICYT (3464/83) y Fundación Ramón Areces.

A Guillermo  
A mi padre  
A mi madre

## CONTENIDO

INTRODUCCION .....	1
1. Electrofisiología de células secretoras .....	1
1.1. Técnicas de estudio .....	2
a) Registro intracelular .....	2
b) Registro de corrientes iónicas con la técnica de "patch clamp" .....	4
1.2. Conductancias iónicas .....	8
a) Canales de sodio .....	8
b) Canales de calcio .....	10
c) Canales de potasio .....	13
d) Canales de cloro .....	14
2. Fenómenos eléctricos y acoplamiento estímulo-secreción .....	15
3. Acoplamiento estímulo-secreción en células adrenocorticales .....	26
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL Y METODOS.....	37
1. Cultivo celular .....	37
2. Registro intracelular .....	40
2.1. Soluciones.....	40
2.2. Microelectrodos .....	41
2.3. Electrónica .....	42
2.4. Dispositivo experimental .....	49
2.5. Proceder experimental .....	52

3. Registro con la técnica de "patch clamp" .....	54
3.1. Soluciones .....	54
3.2. Micropipetas .....	55
3.3. Electrónica .....	58
3.4. Dispositivo experimental .....	67
3.5. Proceder experimental .....	69
4. Análisis de los datos .....	74
RESULTADOS.....	76
1. Registro intracelular. Potenciales de acción de calcio .....	76
1.1. Constantes eléctricas pasivas .....	76
1.2. Potenciales de acción .....	79
1.3. Conductancias iónicas .....	86
2. Registro con la técnica de "patch clamp". Canal de $K^+$ activado por $Ca^{2+}$ .....	92
2.1. Estudio del canal "in situ" .....	93
2.2. Dependencia de la concentración de calcio intracelular .....	96
2.3. Conductancia .....	102
2.4. Características cinéticas .....	104
2.5. Selectividad y efecto de otros iones .....	112
2.6. Densidad de canales de $K^+$ activados por $Ca^{2+}$ .....	118
2.7. Otros canales de $K^+$ .....	119
DISCUSION .....	121
1. Características electrofisiológicas de las células adrenocorticales .....	121

2. Conductancias iónicas en células	
adrenocorticales .....	125
2.1. Conductancia al $\text{Ca}^{2+}$ .....	125
2.2. Conductancia al $\text{K}^{+}$ activada por $\text{Ca}^{2+}$ .....	126
3. Posible papel de las conductancias iónicas en el	
proceso de acoplamiento estímulo-secreción .....	140
CONCLUSIONES.....	150
REFERENCIAS .....	156

## INTRODUCCION

### 1. Electrofisiología de células secretoras

La secreción es un fenómeno celular básico que se observa en células de distinta procedencia embriológica y que participa en gran número de funciones biológicas. Clásicamente el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la secreción celular se ha llevado a cabo con métodos bioquímicos, sin embargo, en la última década se ha producido un desarrollo considerable de la electrofisiología de células secretoras (veáse Petersen, 1980). Los estudios electrofisiológicos han demostrado que gran número de estas células producen potenciales de acción y que, en aquellas donde no se observan fenómenos eléctricos autorregenerativos, se producen cambios lentos del potencial de membrana que igualmente parecen relacionarse con el proceso de acoplamiento entre el estímulo y la secreción.

Como se ha referido anteriormente, la metodología electrofisiológica, empleada en un primer momento casi de forma exclusiva en el estudio de las células consideradas como "excitables" (neuronas y fibras musculares) no se ha utilizado en la investigación de la secreción hasta fecha muy reciente debido, en parte, a la limitación impuesta por el pequeño tamaño de las células secretoras. No obstante, el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas electrofisiológicas alcanzado en los últimos 3 ó 4 años ha incrementado de forma espectacular el conocimiento sobre los mecanismos moleculares implicados



en la secreción celular. En los apartados siguientes se describen, de forma general, las técnicas electrofisiológicas empleadas en la investigación sobre células secretoras y se expone la información obtenida con estas técnicas, haciendo hincapié en los tipos de conductancias iónicas presentes en la membrana y sus modificaciones por secretagogos.

### 1.1. Técnicas de estudio

#### a) Registro intracelular

Mediante el registro intracelular en células secretoras se ha obtenido información sobre los valores del potencial de membrana, la dependencia de éste de las concentraciones de iones extracelulares y los cambios de potencial que, en cada caso, aparecen en presencia del estímulo para la secreción.

Desde el trabajo pionero de Lundberg (1955) en células de las glándulas submaxilares se ha registrado el potencial de membrana en gran cantidad de células secretoras, tanto exocrinas como endocrinas. Los valores de este potencial descritos en la literatura son muy variables y de hecho se han ido incrementando a medida que ha mejorado la técnica de registro intracelular. Por ejemplo, el potencial de membrana de células beta del páncreas medido inicialmente por Dean y Matthews (1970) fue de  $-20 \pm 0,8$  mV, mientras que en estudios más recientes se han registrado valores entre  $-50$  y  $-60$  mV (Meissner y Schmelz, 1974; Atwater y col., 1978). En

células paratiroides (López Barneo y Armstrong, 1983) y de la corteza suprarrenal (Matthews y Saffran, 1973; Tabares y López Barneo, 1985) se han medido valores de hasta  $-85$  mV (véase "Resultados").

Las conductancias iónicas responsables del mantenimiento del potencial de membrana en reposo en células secretoras son semejantes a las observadas en otras células (Hodgkin y Horowicz, 1959). En general, la membrana en reposo es poco permeable al  $\text{Na}^+$ , siendo el  $\text{K}^+$  el ión más permeable; los iones de  $\text{Cl}^-$  parecen distribuirse de forma pasiva según su gradiente electroquímico (Atwater y col., 1978; Petersen, 1980; López Barneo y Armstrong, 1983).

El potencial de reposo en células secretoras varía en presencia de sustancias que estimulan la secreción. En diferentes células glandulares se han podido observar los cambios de potencial inducidos por los secretagogos y, con la ayuda de bloqueantes específicos, caracterizar las conductancias iónicas responsables de éstos. En algunas células secretoras, como por ejemplo en células cromafines (Brandt y col., 1976), adenohipofisarias (Kidokoro, 1975; Taraskevich y Douglas, 1977) y en células beta del páncreas (Dean y Matthews, 1970; Meissner y Schmelz, 1974), el estímulo para la secreción induce fenómenos eléctricos autorregenerativos (potenciales de acción) debidos a cambios rápidos en la permeabilidad de la membrana a distintos iones, generalmente  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ .

En otros tipos celulares, como por ejemplo en células paratiroides (López Barneo y Armstrong, 1983) y en la mayoría de las células exocrinas (Petersen, 1980), los cambios de potencial de membrana inducidos por secretagogos son lentos y no se observan potenciales de acción. En cada tipo de célula secretora el estímulo para la secreción da lugar a la aparición de un patrón específico de actividad eléctrica que, como se expone más adelante, forma parte del proceso de acoplamiento entre el estímulo y la secreción.

b) Registro de corrientes iónicas con la técnica de "patch clamp"

La técnica de "patch clamp", descrita por Neher y col. (1978) y perfeccionada recientemente (Hamill y col., 1981) permite la realización de estudios electrofisiológicos cuantitativos en células de pequeño tamaño. Mediante esta técnica es posible resolver la corriente que fluye a través de un canal iónico y registrar las corrientes iónicas generadas en la totalidad de la membrana celular, mediante fijación del voltaje, con una calidad semejante a las obtenidas en el axón gigante del calamar. Experimentos de "patch clamp" en células secretoras están dando información a nivel molecular acerca de los mecanismos que regulan la permeabilidad iónica de la membrana y de las modificaciones de ésta por los secretagogos (véase Sakmann y Neher, 1983).

La técnica de "patch-clamp" consiste en el

aislamiento eléctrico de un área pequeña de membrana mediante la aplicación de una pipeta a la superficie de una célula y establecimiento de un sello entre el vidrio y la membrana con una resistencia eléctrica  $> 10^9 \Omega$ . Las distintas configuraciones de esta técnica (véase Figura 1) así como las aplicaciones de cada una de ellas se exponen a continuación.

En la configuración "cell-attached" se conserva la integridad de la célula y se registra sobre un área pequeña de membrana cuya superficie externa está en contacto con la solución del electrodo y la interna permanece en contacto con el citoplasma. En esta configuración, el potencial de la cara interna del área de membrana aislado por la pipeta es mantenido constante por el potencial de membrana del resto de la célula, mientras que el potencial de la cara externa depende del aplicado a la entrada positiva del amplificador de registro (véase "Métodos"). En esta configuración se registra la corriente que pasa a través de los canales iónicos incluidos en este área de membrana, pudiéndose estudiar los parámetros eléctricos y cinéticos de los mismos, así como las modificaciones de éstos por la aplicación extracelular de hormonas y neurotransmisores que actúan a través de mediadores químicos intracelulares. Así, por ejemplo, se ha demostrado que en células acinares del páncreas la acetil colina (ACh) y la colecistoquinina (CCK) activan un canal catiónico a

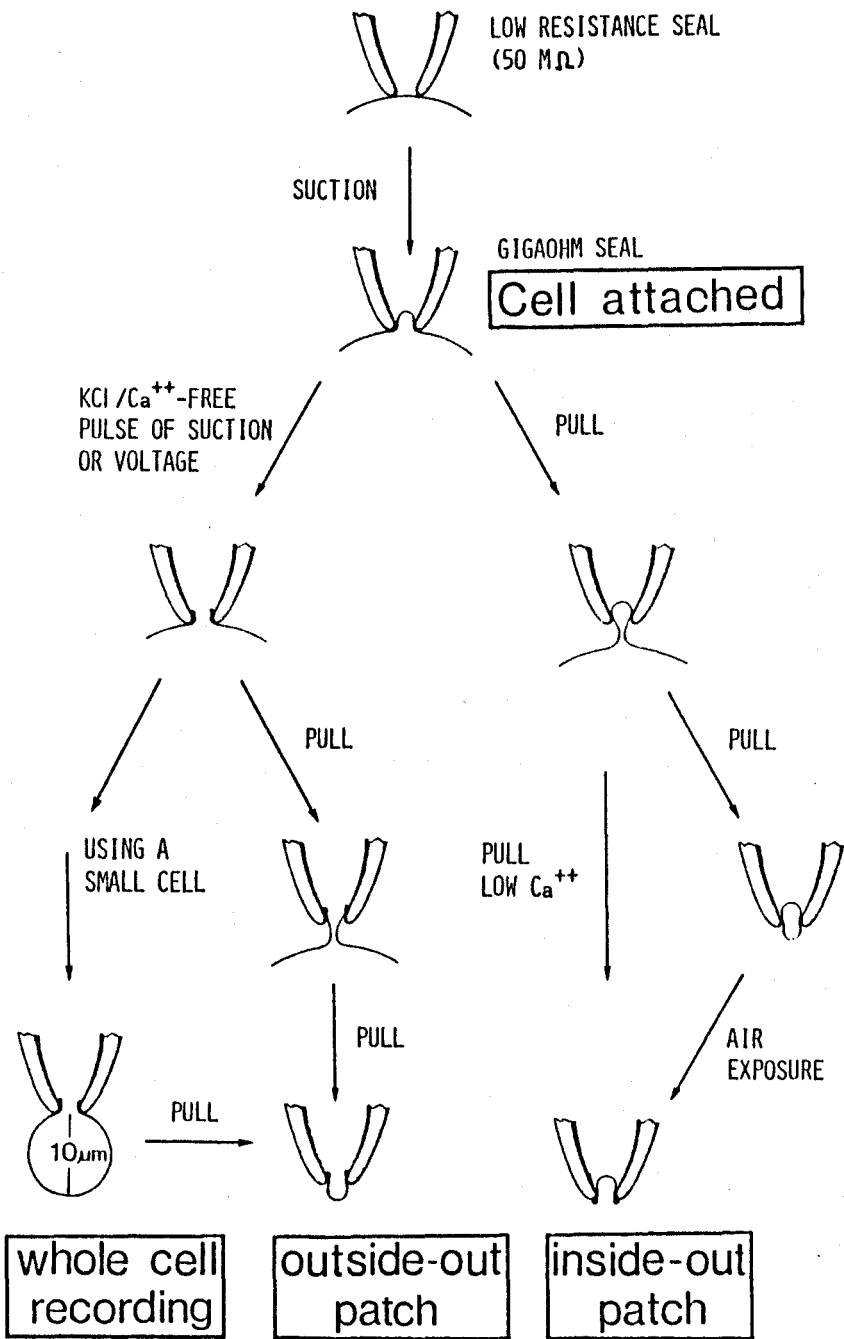


Figura 1. Esquema de las diferentes configuraciones de "patch clamp" y de las manipulaciones necesarias para su obtención. (Tomada de Hamill y col., 1981).

través de un aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol (Maruyama y Petersen, 1982b), o que el aumento de la concentración extracelular de glucosa induce el cierre de un canal de  $\text{K}^+$  en la célula beta del páncreas (Ashcroft y col., 1984).

En la configuración "inside-out" se registra la corriente que pasa a través de los canales iónicos incluidos en un área pequeña de membrana pero, en este caso, separada del resto de la célula. Esta configuración se obtiene a partir de la situación de "cell-attached" antes referida retirando la pipeta de la célula y escindiendo de ella el área de membrana sellada a ésta. De esta forma la superficie interna del parche de membrana escindido queda en contacto con la solución del baño y la externa con la de la pipeta. En esta configuración se puede cambiar fácilmente la composición iónica de la solución que baña la cara interna de la membrana, así como estudiar directamente los factores intracelulares que regulan la permeabilidad iónica de la membrana (Marty, 1981; Barrett y col., 1982; Cook y Hales, 1984; Cook y col., 1984; Tabares y col., 1985).

En la configuración "outside-out" también se registra la corriente que fluye a través de los canales en un área de membrana escindido del resto de la célula, aunque en esta situación la cara externa de la membrana está en contacto con la solución del baño y la interna con la de la pipeta. Esta configuración, cuya forma de obtención se

ilustra en la Figura 1, se utiliza principalmente para estudiar los efectos sobre los canales de secretagogos y agentes bloqueantes que actúan sobre la cara externa de la membrana (Hamill y Sakmann, 1981; Hamill y col., 1983).

En la configuración "whole cell", a diferencia de las anteriores, se mantiene bajo fijación de voltaje la totalidad de la membrana celular y se registran corrientes iónicas totales. En esta configuración la solución del electrodo se equilibra rápidamente con la de la célula, por lo que se puede estudiar el efecto sobre las corrientes iónicas totales de la sustitución iónica o la adición de bloqueantes en el medio intra y extracelular (Fenwick y col., 1982b; Matteson y Armstrong, 1984; Armstrong y Matteson, 1985; López Barneo y Armstrong, 1985).

## 1.2. Conductancias iónicas

Los fenómenos electrofisiológicos que se observan en células secretoras son debidos a la modificación de conductancias iónicas de la membrana que, desde el punto de vista molecular, representan la apertura y cierre de canales iónicos. En los apartados que siguen se analizan brevemente las características generales de las conductancias iónicas (canales) registradas en diferentes tipos de células secretoras.

### a) Canales de sodio

Hodgkin y Huxley (1952) mediante la técnica de fijación de voltaje en el axón gigante del calamar fueron

los primeros en demostrar que un aumento de la conductancia de la membrana a los iones de  $\text{Na}^+$  es responsable de la generación del potencial de acción. Recientemente, mediante la técnica de "patch clamp", ha sido posible registrar tanto la corriente de  $\text{Na}^+$  que atraviesa un solo canal, como la corriente total de  $\text{Na}^+$  en preparaciones de mucho menor tamaño que el axón gigante. Estos estudios se han llevado a cabo sobre todo en células del músculo estriado (Sighworth y Neher, 1980; Horn y Patlak, 1980; Horn y col., 1981), miocardio (Cachelin y col., 1983b) y células de neuroblastoma (Aldrich y col., 1983).

En algunas células secretoras, como las células cromafines (Fenwick y col., 1982b) y GH3 hipofisarias (Matteson y Armstrong, 1984), se han registrado corrientes de  $\text{Na}^+$  de características similares a la descrita por Hodgkin y Huxley en fibras nerviosas. En células cromafines se ha calculado que la densidad de canales de  $\text{Na}^+$  por unidad de superficie es de  $1,5-10/\mu\text{m}^2$  y que la conductancia de un canal es aproximadamente 15 pS; en células GH3 la densidad de canales de  $\text{Na}^+$  parece ser algo mayor, entre  $40-50/\mu\text{m}^2$ , aunque este valor es aún unas 10 veces menor que en el axón gigante del calamar (Armstrong, 1975; Conti y col., 1975).

Al igual que en células nerviosas y musculares, la función de una conductancia para los iones de  $\text{Na}^+$  en células secretoras parece ser la despolarización rápida



de la membrana y, por lo tanto, la activación de una conductancia para los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que, como se verá más adelante, se relaciona directamente con el proceso de secreción.

Las sustancias más utilizadas como bloqueantes específicos para los canales de  $\text{Na}^+$  son la tetrodotoxina (TTX) y la saxitoxina (STX) (Narahashi, 1974). Ambas se unen con gran afinidad a la cara externa del canal e impiden el paso de  $\text{Na}^+$ . Desde el punto de vista bioquímico, el canal de  $\text{Na}^+$  es uno de los más ampliamente estudiados; recientemente, mediante técnicas de fraccionamiento y purificación de proteínas se ha podido determinar la secuencia completa de los aminoácidos que componen este canal (Noda y col., 1984).

#### b) Canales de calcio

La existencia en membranas biológicas de una conductancia despolarizante, distinta de la descrita por Hodgkin y Huxley en 1952 para los iones de  $\text{Na}^+$ , se conoce desde hace tiempo y se pensó que se debía a la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . En un gran número de células endocrinas coexisten ambas conductancias como lo demuestran, por ejemplo, los registros realizados en células de la hipófisis (Kidokoro, 1975) y de la médula adrenal (Biales y col., 1976). Recientemente, se ha conseguido registrar la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en la terminación presináptica del axón gigante del calamar con la técnica de fijación de voltaje (LLinás y col., 1983) y, mediante la técnica de "patch

clamp", en algunas preparaciones como neuronas en cultivo (Lux y Nagy, 1981; Brown y col., 1982), músculo cardiaco (Reuter y col., 1982; Bean y col., 1983), células cromafines (Fenwick y col., 1982b) y células GH3 (Hagiwara y Ohmori, 1982 y 1983; Matteson y Armstrong, 1984; Armstrong y Matteson, 1985).

La activación de la corriente de  $Ca^{2+}$  es unas 10 a 20 veces más lenta que la de  $Na^{+}$  pero, como en ésta, tanto la activación como la inactivación dependen del potencial de membrana. El número de canales activos así como el tiempo que permanecen éstos abiertos aumenta con la despolarización (Reuter y col., 1982). No obstante, en algunos tipos celulares además de activarse por la despolarización, los canales de  $Ca^{2+}$  están modulados por neurotransmisores. En células del miocardio en cultivo, la adrenalina y la noradrenalina aumenta la probabilidad de estos canales de estar abiertos, posiblemente debido a la fosforilación del mismo por una proteínkinasa dependiente de AMPc (Reuter, 1983).

La conductancia de los canales de  $Ca^{2+}$  es muy pequeña, aproximadamente de 12-15 pS y el registro de la corriente que fluye por un solo canal presenta algunas dificultades, pues además de que es necesaria una buena relación señal/ruido, hasta la fecha y por causas desconocidas, este canal solo se ha podido poner de manifiesto en la configuración "cell-attached". En células secretoras se desconoce si, al igual que en el músculo cardiaco estos

canales pueden ser modulados por neurotransmisores y hormonas. Sin embargo, en células endocrinas parecen existir distintos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Armstrong y Matteson (1985) han registrado la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  en células GH3 en la configuración de "whole cell", y sugieren que en estas células existen dos poblaciones distintas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , una formada por canales que se activan más lentamente y a más bajo umbral que los otros y que se inactivan aproximadamente después de 100 ms, y otra, formada por canales que permanecen abiertos más tiempo que los anteriores pero que se deactivan más rápidamente. La existencia de dos poblaciones de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  está en concordancia con la participación de éstos también en dos funciones distintas, por un lado el incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , necesario para la secreción (posiblemente sean los canales más rápidos y de más alto umbral los responsables) y por otro, la generación del disparo repetitivo o potencial de marcapaso (debida seguramente a la activación de los canales más lentos y de más bajo umbral.)

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en general son permeables además de al  $\text{Ca}^{2+}$ , al  $\text{Ba}^{2+}$  y al  $\text{Sr}^{2+}$  pero no al  $\text{Mg}^{2+}$  ni a otros metales pesados como  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  (Okamoto y col., 1976) y  $\text{Cd}^{2+}$  (Kostyuk y col., 1977). El mecanismo por el cual estos metales son capaces de bloquear los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no se conoce, quizás se unan con mayor

especificidad que el  $\text{Ca}^{2+}$  a cargas del canal, o bien, por efecto físico de su tamaño lo taponan e impiden, por tanto, el paso de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además de los anteriores, son también bloqueantes algunas sustancias de origen orgánico como el verapamil y su derivado metoxi D600 (Kohlhardt y col., 1972).

Recientemente se han descubierto distintas sustancias como las dihidropiridinas que se unen específicamente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y son capaces de modificar la actividad de los mismos (Tsien, 1983). Estas sustancias están empezando a ser utilizadas, por ejemplo, para la purificación y reconstrucción de los canales (Hess y col., 1984).

### c) Canales de potasio

Se conocen en la actualidad distintos tipos de canales de  $\text{K}^+$  atendiendo al valor de su conductancia, cinética, selectividad iónica, etc. En células endocrinas se han registrado varios tipos, siendo los mejor estudiados los modulados por iones o metabolitos intracelulares. Sobre los canales de  $\text{K}^+$  de rectificación anómala y retrasada se sabe poco en estas células.

Se han identificado hasta el momento tres tipos de canales cuya activación depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Petersen y Maruyama, 1984), aunque el mejor estudiado de los tres es el de mayor conductancia (aprox. 200 pS). En células endocrinas la corriente a través de este último se ha registrado con la técnica de

"patch clamp" en células cromafines (Marty, 1981), adenohipófisis (Wong, 1982) y en células beta del páncreas (Cook y col., 1984). La probabilidad de este canal de estar en estado abierto depende del voltaje y de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque probablemente puede afectarse además por otros factores intracelulares; en células beta del páncreas se ha visto que su actividad depende así mismo de la concentración intracelular de protones, que a su vez está en función del metabolismo de la glucosa (Cook y col., 1984). Más características de este canal se verán en el apartado de "Discusión".

#### d) Canales de cloro

Aunque la información disponible acerca de los canales de  $\text{Cl}^-$  es escasa, se sabe que existen varios tipos. En células de las glándulas lagrimales se ha identificado un canal de  $\text{Cl}^-$  de muy pequeña conductancia y cuya activación depende de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Marty y col., 1984); en otras preparaciones se han registrado así mismo canales para este ión, aunque, de características muy distintas; por ejemplo, en neuronas espinales en cultivo (Hamill y col., 1983) y en neuronas del hipocampo (Bormann y col., 1983) se ha identificado un canal de  $\text{Cl}^-$  de mediana conductancia que parece estar acoplado al receptor para la glicina y al receptor para el ácido gamma-aminobutírico (GABA), mientras que en miotúbulos (Blatz y Magleby, 1983), en células de

Schwann (Bevan y col., 1984) y en células del miocardio en cultivo (Coulombe y Duchohier, 1984) se ha registrado un canal de  $\text{Cl}^-$  de muy alta conductancia ( $>400$  pS).

El papel funcional de los canales de  $\text{Cl}^-$  en las células excitables parece estar relacionado con la frecuencia de disparo de los potenciales de acción. En las células de las glándulas lagrimales puede relacionarse con la secreción de electrólitos por la misma.

## 2. Fenómenos eléctricos y acoplamiento estímulo-secreción

El término "acoplamiento estímulo-secreción" fue acuñado por Douglas en 1968 y se refiere a la secuencia de hechos que van desde el reconocimiento de un estímulo externo por una célula hasta la liberación del producto de secreción. En células endocrinas este proceso es en muchos aspectos similar al que ocurre en las sinapsis químicas del sistema nervioso y en uniones neuromusculares. En estas dos últimas se sabe desde hace tiempo que la liberación del neurotransmisor se realiza por exocitosis y que ésta se activa por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el terminal presináptico a través de canales voltaje-dependientes (del Castillo y Katz, 1952; Katz y Miledi, 1967). En la sinapsis gigante del calamar se ha registrado recientemente la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  presináptica (LLinás y col., 1983) y en la unión neuromuscular de la rana se han realizado estudios morfológicos que muestran que la liberación de neurotransmisor se realiza por exocitosis (Heuser y col., 1974).

En base a estas observaciones se ha sugerido que en células endocrinas que segregan por exocitosis el aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  es la señal que dispara la secreción (Douglas, 1968; Rubin, 1974).

A continuación se expone de forma general los diferentes tipos de patrones electrofisiológicos registrados en células endocrinas y las conductancias identificadas hasta el momento, así como su posible relación con el proceso de acoplamiento entre el estímulo y la secreción. Dentro de las células endocrinas que producen potenciales de acción se analiza la actividad eléctrica de las células cromafines, células beta del páncreas y células adenohipofisarias. Como caso particular de célula endocrina sin capacidad para producir potenciales de acción se citan las células paratiroideas. Los datos electrofisiológicos existentes sobre células secretoras de esteroides se presentan en el apartado siguiente.

Las células cromafines de la médula adrenal poseen numerosas características comunes con las neuronas. En presencia del estímulo para la secreción (la ACh), las células cromafines segregan catecolaminas por exocitosis (Douglas y Rubin, 1961) y producen potenciales de acción (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980) (véase Figura 2). La ACh al unirse a su receptor de membrana da lugar a una despolarización de la

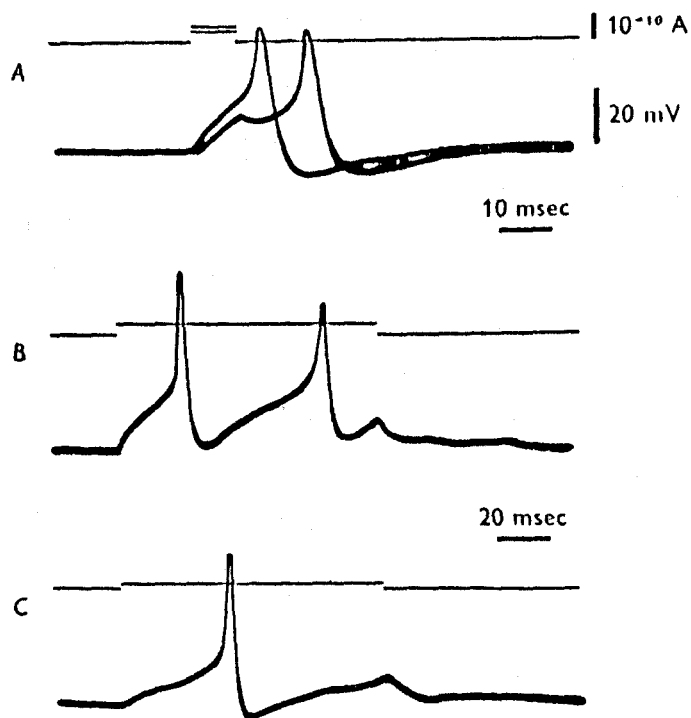


Figura 2. A, B y C. Potenciales de acción en células cromafines producidos por la inyección de pulsos de corriente de amplitud y duración variable a través de un microelectrodo. Potencial de membrana: -45 mV. (Tomada de Brandt y col., 1976).

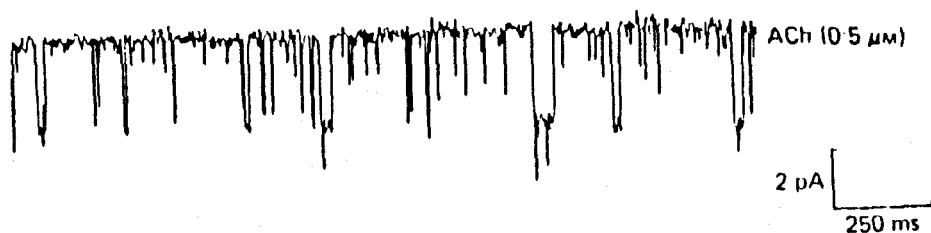


Figura 3. Registro mediante la técnica de "patch clamp" de la corriente iónica que atraviesa un canal activado por ACh en la membrana de una célula cromafin. La apertura del canal aparece como un pulso cuadrado de corriente hacia el interior de la célula. (Tomada de Clapham y Neher, 1984b).



célula y a la producción de potenciales de acción por un aumento de la permeabilidad de la membrana al  $\text{Na}^+$  y en menor proporción, al  $\text{Ca}^{2+}$ . Al aumento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  durante los potenciales de acción se le atribuye la puesta en marcha del proceso de exocitosis (Douglas y Rubin, 1963; Douglas y col., 1967). Recientemente, el registro individual de estas conductancias y su activación por el estímulo para la secreción ha sido posible mediante la utilización de la técnica de "patch clamp" (Fenwick y col., 1982a,b; Clapham y Neher, 1984a,b) (véase Figura 3). De especial interés es la identificación de un canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  que posiblemente participa en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Marty, 1981).

Las células beta del páncreas, al igual que las cromafines, generan potenciales de acción en presencia del secretagogo (Dean y Matthews, 1968 y 1970). En estas células, la glucosa, y algunas otras sustancias como la tolbutamida y la leucina, dan lugar a la aparición de un patrón específico de actividad eléctrica que consiste en una despolarización lenta, de unos 10-20 mV, seguida de una meseta sobre la que aparece un brote de potenciales de acción tras el cual la célula se repolariza hasta el nivel de reposo, repitiéndose este ciclo cada 3 a 6 s (Meissner y Schmelz, 1974; Matthews y Sakamoto, 1975a,b; Meissner, 1976). La duración de la meseta y el número de potenciales de acción que sobre ella aparecen está en

función directa con la concentración de glucosa (ver Figura 4). El efecto de la glucosa sobre el potencial de membrana es muy específico como lo demuestra que análogos como la L-glucosa o la 2-desoxiglucosa sean ineficaces para provocar la despolarización (Dean y col., 1975). El mecanismo por el cual la glucosa, o algunos de los metabolitos de su degradación enzimática intracelular, producen una despolarización parece ser mediante una disminución de la permeabilidad de la membrana al  $K^+$ , como ha podido ser demostrado recientemente de forma directa con la técnica de "patch clamp" por Ashcroft y col. (1984) (ver Figura 5). La despolarización inducida por la glucosa da lugar a la activación de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes y a la producción de los potenciales de acción. El aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  durante el potencial de acción es el factor desencadenante de la secreción de insulina, ya que, en ausencia de glucosa, puede provocarse la secreción mediante la inyección intracelular de corriente despolarizante e inhibirse ésta, aún en presencia de glucosa, bloqueando los canales de  $Ca^{2+}$  (Atwater y col., 1978 y 1979). La repolarización de la meseta se debe a la activación de una  $G_{K(Ca)}$  (Atwater y col., 1979), conductancia que se ha demostrado recientemente de forma directa con la técnica de "patch clamp"; en relación con los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  se ha descrito que la acidificación del medio intracelular disminuye su activación (Cook y col., 1984),

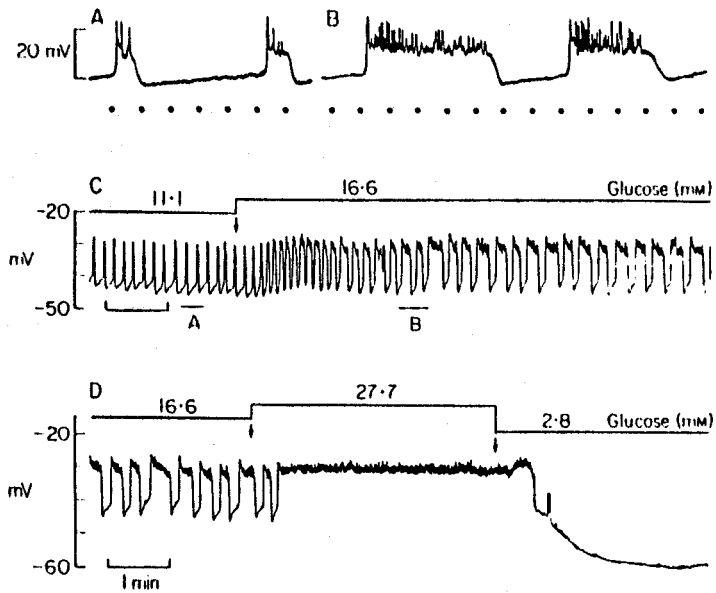


Figura 4. Registro intracelular del efecto de los niveles extracelulares de glucosa sobre la actividad eléctrica en células beta del páncreas. Obsérvese la aparición de potenciales de acción en forma de brotes sobre una meseta de despolarización y como la duración de la misma y el número de potenciales aumenta con la concentración de glucosa. (Tomada de Meissner, 1976).

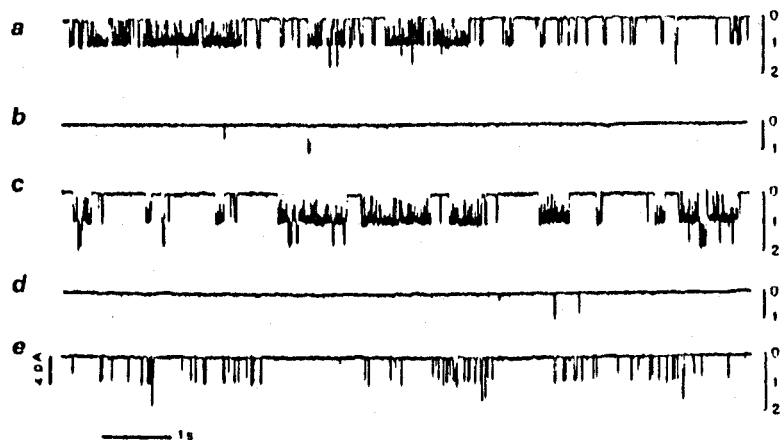


Figura 5. Registro mediante la técnica de "patch clamp", en la configuración de "cell-attached" y al potencial de membrana, del efecto de los niveles extracelulares de glucosa sobre la actividad de dos canales de K en la membrana de una célula beta. a) en una solución sin glucosa; b) 7 min. después de cambiar a una solución con 20 mM glucosa; c) 12 min. después de volver a una solución sin glucosa; d) 4 min. después de perfundir con una solución con 20 mM glucosa; e) 2 min. después de perfundir con una solución con 20 mM glucosa más 20 mM mannoheptulosa. Obsérvese que los canales permanecen más tiempo cerrados a mayor concentración de glucosa en el medio extracelular. (Tomada de Ashcroft y col., 1984).

lo que puede interpretarse como un mecanismo de conexión entre la actividad metabólica y la eléctrica. Otro dato que apoya esta relación es la identificación en células beta de otro tipo de canal de  $K^+$  cuyo cierre depende de la concentración intracelular de ATP (Cook y Hales, 1984).

Dentro de las células adenohipofisarias las más intensamente estudiadas con técnicas electrofisiológicas han sido las GH3, una línea de células modificadas derivadas de la adenohipófisis. Estas células segregan prolactina y hormona del crecimiento y producen potenciales de acción (Kidokoro, 1975; Biales y col., 1977) en presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular; la duración y la frecuencia de los potenciales de acción aumenta en presencia de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y otros secretagogos (Taraskevich y Douglas, 1980) (véase Figura 6). Los potenciales de acción se deben a un aumento de la permeabilidad de la membrana al  $Ca^{2+}$ , y en menor proporción al  $Na^+$ ; la entrada de  $Ca^{2+}$  durante los potenciales de acción se relaciona directamente con la liberación hormonal ya que, en presencia de bloqueante para los canales de  $Ca^{2+}$  ( $Co^{2+}$  o verapamil) se suprimen tanto éstos como la secreción de prolactina inducida por la TRH (Ozawa y Kimura, 1982). El efecto de la TRH sobre las permeabilidades iónicas de la membrana no se conoce, aunque algunos datos experimentales sugieren que el receptor para la TRH regula o forma parte de un canal de  $K^+$  de forma que la unión de la hormona al receptor aumenta

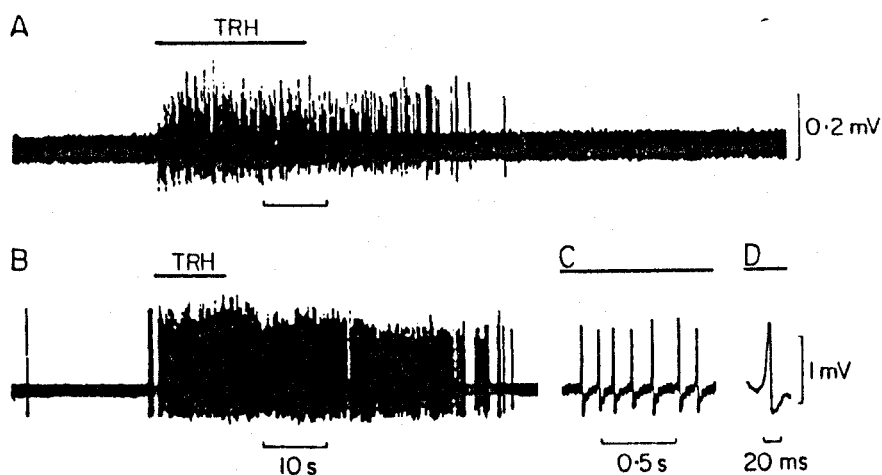


Figura 6. Potenciales de acción en células de la adenohipófisis. En A la aplicación de 50 nM de TRH durante el tiempo indicado dió lugar a la generación de potenciales de acción en una célula previamente silente. En B la aplicación de 5 nM de TRH aumentó la frecuencia de disparo de una célula con actividad espontánea. C y D. Potenciales de acción del registro B a una base de tiempo más rápida. (Tomada de Taraskevich y Douglas, 1977).

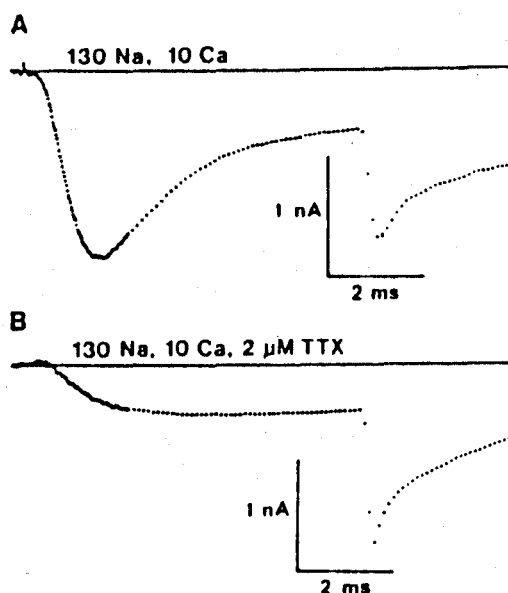


Figura 7. Registro mediante la técnica de "patch clamp", en la configuración de "whole cell", de corriente iónica total que atraviesa la membrana de una célula GH3 a un potencial de membrana de +20 mV. A. Corrientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . B. Corriente aislada de  $\text{Ca}^{2+}$  por el bloqueo con TTX de los canales de  $\text{Na}^+$ . (Tomada de Matteson y Armstrong, 1984).

la probabilidad de que el canal se cierre y, por tanto, de que la célula se despolarice y se activen así las conductancias responsables de la generación de los potenciales de acción (Kaczorowski y col., 1983). Con la técnica de "patch clamp" se ha registrado la corriente que fluye por un solo canal de Ca (Hagiwara y Ohmori, 1983), así como las corrientes totales de  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  y  $K^+$  (Hagiwara y Ohmori, 1982; Matteson y Armstrong, 1984; Armstrong y Matteson, 1985; Dubinsky y Oxford, 1985) (véase Figura 7).

En células paratiroides el mecanismo de acoplamiento entre el estímulo y la secreción parece diferir del observado en las células referidas anteriormente. El estímulo para la secreción, una disminución de la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$ , produce modificaciones importantes del potencial de membrana como se ha comprobado en experimentos realizados en ratones (Bruce y Anderson, 1979), ratas (López Barneo y Armstrong, 1983) y vacas (Morrissey y Klahr, 1983). López Barneo y Armstrong (1983) han observado mediante la técnica de registro intracelular con microelectrodos de vidrio que, una disminución en la concentración extracelular de  $Ca^{2+}$  de 2,5 a 1,5 mM da lugar a una hiperpolarización de unos 40 mV del potencial de membrana, y que por el contrario, un aumento de  $Ca^{2+}$  extracelular provoca una despolarización que se acompaña además de un aumento de la resistencia de la membrana

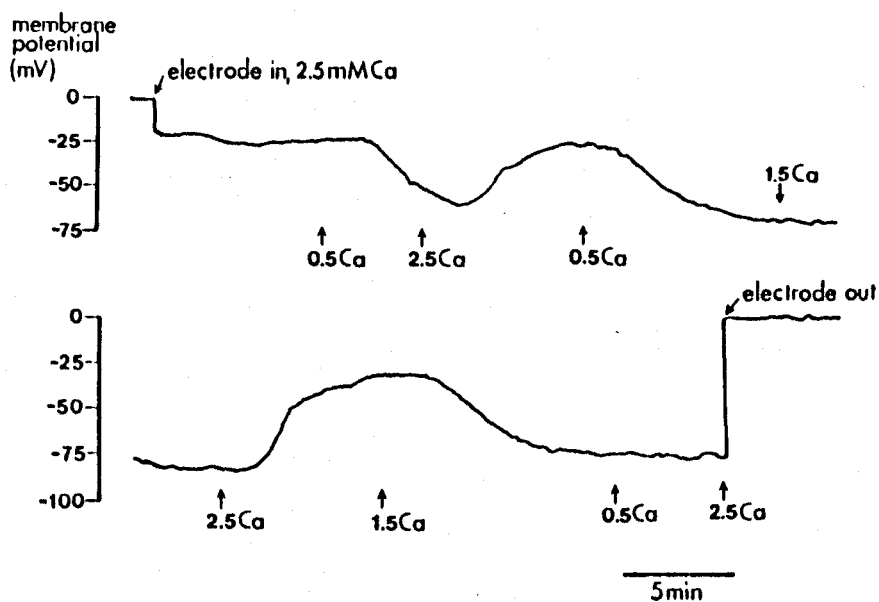


Figura 8. Registro intracelular de las modificaciones del potencial de membrana en una célula paratiroides ante cambios en la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . La célula se despolariza unos 40 mV por un cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 2,5 a 1,5-0,5 mM y se hiperpolariza otro tanto por un cambio inverso. (Tomada de López Barneo y Armstrong, 1983).

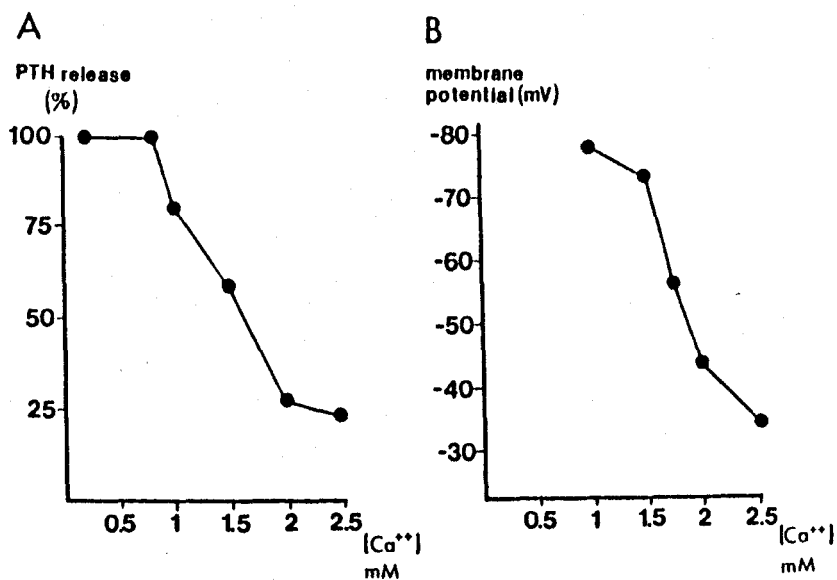


Figura 9. Efecto de las variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre la secreción de PTH (A) y el potencial de membrana (B). Obsérvese el paralelismo existente entre ambos fenómenos. (Tomada de Habener y Potts, 1976 (A) y López Barneo y Armstrong, 1983 (B)).

(véase Figura 8). Esta respuesta electrofisiológica a las variaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  externo, al igual que la secreción de parathormona (PTH), es dosis dependiente de forma que a menor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, hasta una concentración de 0,5-1 mM, mayor es la hiperpolarización (véase Figura 9). La relación existente entre los cambios eléctricos y la secreción en estas células, así como el mecanismo por el cual se detecta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y esto se traduce en un aumento de secreción de PTH no se conocen. Al contrario que en otras células secretoras, el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no parece ser necesario para la secreción ya que en ausencia de éste la secreción de PTH es máxima y en presencia de bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (D600) la secreción no se modifica (Wallace y col., 1983).

Recientemente se han registrado en estas células varios tipos de canales de  $\text{K}^+$  que pueden participar en la generación de estos cambios lentos del potencial de membrana (López Barneo y col., 1985).



### 3. Acoplamiento estímulo-secreción en células adrenocorticales

Las células de la zona fasciculada de la corteza adrenal segregan glucorticoides en respuesta a la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La información de que se dispone en la actualidad acerca de los mecanismos que regulan la secreción de esteroides en estas células es particularmente abundante en relación con los aspectos puramente bioquímicos, no obstante, es escasa con respecto a los fenómenos eléctricos que en ellas ocurren y que posiblemente, al igual que en otras células secretoras, se relacionan con el proceso de acoplamiento estímulo-secreción.

Aunque nuestro trabajo experimental se basa en el análisis de los fenómenos biofísicos a nivel de la membrana de las células adrenocorticales, a continuación se expone de forma general los aspectos bioquímicos más importantes relacionados con la síntesis y la secreción de esteroides; con ello, se pretende ofrecer una visión amplia acerca de los fenómenos biológicos que tienen lugar en estas células con los que se integran los datos electrofisiológicos existentes y los obtenidos en el presente estudio.

La ACTH estimula la síntesis de glucocorticoides por las células de la corteza adrenal "in vivo" (Swann, 1940) e "in vitro" (Hechter, 1949; Saffran y col., 1952). Aunque son numerosos los trabajos sobre el modo de acción de la ACTH en relación con la síntesis de esteroides, los

mecanismos moleculares básicos subyacentes a esta acción no se conocen aún con exactitud. La unión de la ACTH a su receptor en la membrana plasmática se sabe da lugar a la activación de una adenilciclase y subsiguientemente a un aumento de los niveles intracelulares de AMPc (Haynes, 1958). Este nucleótido tiene la misma acción estimuladora sobre la síntesis de esteroides que la ACTH, por lo que se cree que es el primer eslabón en la acción de esta hormona. Un aumento de AMPc activa la hidrolasa que escinde los ésteres de colesterol (Boyd y Trzeciak, 1973; Beckett y Boyd, 1977) resultando de ello colesterol libre que es transportado a las mitocondrias donde tiene lugar la formación de pregnenolona. La ACTH no solo actúa favoreciendo la hidrólisis de los ésteres del colesterol sino que además participa en la regulación de la síntesis y actividad de enzimas mitocondriales y microsomales (Kramer y col., 1982 y 1983; Ohashi y col., 1983; Funkestein y col., 1983), estimula la captación de colesterol plasmático (Kovanen y col., 1979a,b) y aumenta la síntesis proteica (Ferguson, 1963).

En células adrenocorticales en cultivo, la ACTH aumenta los niveles intracelulares de otros nucleótidos distintos del AMPc, como el GMPC y el IMPc (Kitabchi y Sharma, 1971). En células fraccionadas de la capa fasciculada de la corteza adrenal de rata, la ACTH, a muy bajas concentraciones ( $7 \times 10^{-12}$  M) y en presencia de  $Ca^{2+}$ ,

activa una guanilciclase que da lugar a un incremento de GMPC, y a su vez a un aumento de la esteroidogénesis sin que se observen cambios en la actividad de la adenilciclase; mayores concentraciones de ACTH producen, sin embargo, una disminución de la actividad de la guanilciclase (Nambi y Sharma, 1981).

Desde hace algún tiempo se sabe que una concentración mínima de  $Ca^{2+}$  en el medio de incubación es necesaria para que la ACTH estimule el tejido adrenal "in vitro" (Birmingham y col., 1953), así como que la adición de  $Ca^{2+}$  a homogenados de glándula adrenal estimula la esteroidogénesis (Koritz y Peron, 1959). Más recientemente se ha comprobado que el  $Ca^{2+}$  es necesario para la activación de la adenilciclase "in vitro" por la ACTH (Fakunding y col., 1979; Haksar y Peron, 1973) y también para la hidrólisis de los ésteres del colesterol (Peron y McCarthy, 1968), así como para la separación de la cadena lateral del colesterol en las mitocondrias (Simpson y Williams-Smith, 1975; Farese y Prudente, 1978).

El  $Ca^{2+}$  es considerado por algunos autores como segundo mensajero, al igual que el AMPc, de la acción esteroidogénica de la ACTH (Yanagibashi, 1979). Los receptores intracelulares para el  $Ca^{2+}$  parecen ser tanto la calmodulina (Harper y col., 1980; Hall y col., 1981b; Koletsky y col., 1983) como la proteincinasa C (Culty y col., 1984). La unión del

$\text{Ca}^{2+}$  a una calmodulina parece activar un gran número de enzimas que participan tanto en la regulación directa de la esteroidogénesis (Hall y col., 1981b) como en la regulación del metabolismo de los nucleótidos cíclicos (Kolestsky y col., 1983). Algunos inhibidores de la calmodulina (trifluoperazina y W-7) inhiben tanto la hidrólisis de colesterol inducida por ACTH o AMPc como la secreción de cortisol en células adrenocorticales bovinas (Sekimoto y col., 1984). En células adrenocorticales se ha identificado, además, una proteincinasa C cuya actividad se cree que se relaciona con la esteroidogénesis y que está controlada por la ACTH y, especialmente, por los secretagogos que no actúan a través de la activación del AMPc (angiotensina II y ACh). En células adrenocorticales bovinas en cultivo, tanto la adición de TPA (un ester de forbol que parece tener una acción similar a la del diacilglicerol, producto de escisión del fosfatidilinositol) como la del ionóforo para el  $\text{Ca}^{2+}$  A23187, aumenta la secreción de cortisol, mientras que la adición de estos dos compuestos potencia este efecto sin que se observen variaciones en los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos (Culty y col., 1984).

La ACTH estimula también la captación de colesterol exógeno de forma que la mayor parte del que se utiliza para la síntesis de hormonas esteroideas procede del plasma (Dexter y col., 1970). En presencia de

lipoproteínas de baja densidad (LDL) la secreción de esteroides en respuesta a la ACTH por células adrenocorticales bovinas en cultivo, aumenta de 4 a 9 veces (Kovanen y col., 1979a). El mecanismo por el cual estas células captan el colesterol exógeno ha sido recientemente estudiado; se cree que las lipoproteínas que transportan el colesterol se unen a receptores de la membrana plasmática sufriendo posteriormente un proceso de internalización (Faust y col., 1977; Kovanen y col., 1979a,b; Gwynne, 1978).

En las células adrenocorticales la ACTH, además de actuar sobre la biosíntesis de las hormonas esteroideas, induce una serie de cambios morfológicos y estructurales que parecen relacionarse con la secreción y que resultan de su acción sobre los organelos y el citoesqueleto (Mattson y Kowal, 1982). A este respecto, existen evidencias de que los microfilamentos en las células adrenocorticales no solo participan en el mantenimiento de la forma celular, sino que a través de la ACTH intervienen en la síntesis y quizás también en la secreción de las hormonas esteroideas. Sustancias como la citocalasina B (que impiden la polimerización de la actina) inhiben la síntesis de esteroides inducida por ACTH o AMPc en células Y-1 (Mrotek y Hall, 1975 y 1977) y en estas mismas células anticuerpos anti-actina inhiben la respuesta esteroidogénica de la ACTH o AMPc (Hall y col., 1979).

Existe una amplia información acerca del mecanismo de secreción de las hormonas peptídicas pero es escasa en el caso de las hormonas esteroideas. Mientras que las hormonas peptídicas son almacenadas en forma de gránulos limitados por una membrana externa y el estímulo para la secreción pone en marcha el proceso de exocitosis (Douglas, 1968; Simpson, 1968), la secreción de hormonas esteroideas se ha considerado que tiene lugar por simple difusión (Sabatini y De Robertis, 1961; Luse, 1967; Bloodworthn y Powers, 1968).

Esta hipótesis se basa principalmente en que al ser los esteroides sustancias liposolubles pueden atravesar fácilmente la membrana celular y en que, en condiciones normales, las células almacenan poca cantidad de hormona en el citoplasma ya que es durante la estimulación cuando se sintetiza la mayor parte de la hormona que se libera (Vogt, 1943; Jaanus y col., 1970; Sibley y col., 1980).

La hipótesis de la secreción por simple difusión está también apoyada por algunos trabajos cuyos resultados parecen demostrar que existe una relación directa entre la cantidad de corticosterona segregada por las glándulas suprarrenales y el volumen de la solución de incubación (Sibley y col., 1980 y 1981).

Por otro lado, algunos autores, basándose en resultados obtenidos con técnicas bioquímicas y morfológicas, postulan que la secreción de hormonas esteroideas, al igual que la de las hormonas proteicas,

se realiza por exocitosis (Gemmel y col., 1977; Nussdofen y col., 1977; Pearce y col., 1977).

El  $\text{Ca}^{2+}$  parece desempeñar un papel importante en la liberación de las hormonas esteroideas ya que para que la ACTH aumente la secreción de esteroides es necesaria la presencia de una mínima cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular (Birmingham y col., 1953 y 1960; Jaanus y col., 1970; Sayers y col., 1972; Matthews y Saffran, 1973). Aunque se sabe que la ACTH y el AMPc aumentan la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por las células adrenocorticales (Leier y Jungmann, 1973), el mecanismo por el cual éste interviene en la secreción de esteroides es aún desconocido. La perfusión de la glándula con una solución conteniendo ACTH y  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la concentración de esteroides en la solución de recogida de forma directamente proporcional con la concentración de ACTH y  $\text{Ca}^{2+}$  (éste último hasta un valor de 0,5 M), mientras que la perfusión con una solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  y con ACTH la cantidad de esteroides en la solución de recogida es muy pequeña o nula. El contenido en la glándula de la hormona ya sintetizada en éste último caso es bastante superior que cuando se estimula con ACTH en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jaanus y col., 1970), lo que parece indicar que este ión interviene en la liberación de la hormona.

El efecto de otros cationes divalentes sobre la secreción ha sido estudiado, entre otros, por Jaanus y col. (1970). Cuando se añade  $\text{Mg}^{2+}$  a una solución que

contiene ACTH y  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) se observa una reducción de un 35% en la cantidad de hormona segregada, que aumenta hasta un 50% si el contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  es aún menor (0,5 mM). El  $\text{Sr}^{2+}$  puede reemplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  en su acción sobre la liberación de esteroides en respuesta a la ACTH pero no así el  $\text{Ba}^{2+}$ . Dentro de los iones monovalentes, los niveles extracelulares de  $\text{K}^+$  parecen influir sobre la secreción de esteroides aunque los datos existentes son escasos y poco concluyentes. Un aumento de la concentración extracelular de  $\text{K}^+$  de hasta 47 mM incrementa la secreción basal de glucocorticoides pero no así la que resulta de la estimulación con ACTH. Este segundo tipo de secreción solo aumenta con concentraciones extracelulares de  $\text{K}^+ > 90$  mM (Matthews y Saffran, 1973).

El potencial de membrana de las células de la corteza adrenal ha sido medido en distintas preparaciones mediante la técnica de registro intracelular; en secciones "in vitro" de la corteza del conejo se han registrado valores medios de -71,4 mV (Matthews y Saffran, 1967), en la del gato de -72,8 mV (Natke y Kabala, 1979) y en la del ratón de -75,2 mV (Lymangrover y col., 1982).

En los primeros registros en células adrenocorticales no se encontró relación entre los cambios de potencial de membrana y la secreción de esteroides, de forma que con la estimulación con ACTH no se observaban cambios de potencial (Matthews y Saffran, 1967). Sin embargo, en registros posteriores se ha



observado que en presencia de ACTH y en ausencia de  $K^+$  extracelular aparece actividad espontánea (potenciales de acción) a la vez que una despolarización marcada (Matthews y Saffran, 1968 y 1973). Más recientemente Lymangrover y col. (1982), han mostrado que el aumento de secreción por estimulación con ACTH va precedido por una despolarización lenta cuya magnitud depende de la concentración de la hormona. No obstante, estos estudios no han aportado datos concluyentes desde el punto de vista electrofisiológico.

## OBJETIVOS

El presente trabajo se centra en el estudio de las características electrofisiológicas de células adrenocorticales en cultivo como fase previa al análisis de la posible participación de los fenómenos eléctricos de la membrana en el proceso de acoplamiento estímulo-secreción. Como se ha expuesto en el apartado anterior ("Introducción"), el desarrollo de las técnicas electrofisiológicas en los últimos años ha favorecido el estudio de los mecanismos subyacentes a la regulación de la secreción celular desde un punto de vista biofísico y cuantitativo. Esta información junto a la ya obtenida con metodología bioquímica, está permitiendo un conocimiento más profundo y dando una visión más global de la fisiología de la secreción celular. De acuerdo con las ideas antes expuestas los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

### Objetivos generales

Puesta a punto de las técnicas de registro intracelular y, especialmente, la de registro de corriente iónica transmembrana mediante la técnica de "patch clamp", incluyendo el diseño y construcción del equipo electrónico de registro. Este objetivo lo consideramos de gran importancia, no solo porque aporta una independencia conceptual y metodológica que es de gran importancia en nuestro medio, sino porque además en la investigación biofísica actual el nivel de competitividad depende en

gran medida de la posibilidad de desarrollo de tecnología propia. La preparación escogida (células adrenocorticales en cultivo) presenta así mismo gran interés ya que desde el punto de vista electrofisiológico es desconocida.

#### Objetivos específicos

a) Registro del potencial de membrana en células adrenocorticales en cultivo y caracterización de las propiedades eléctricas pasivas de éstas.

b) Estudio de las características eléctricas activas y análisis de las conductancias iónicas de la membrana de células adrenocorticales.

c) Registro de corrientes iónicas de la membrana a través de un solo canal con la técnica de "patch clamp".

d) Caracterización de los canales iónicos, con especial interés del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de gran conductancia. Este canal está bien estudiado en otros tipos de células pero se desconocía su presencia en células secretoras de hormonas esteroideas.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Cultivo celular

Para la realización de los experimentos se han utilizado células adrenocorticales Y-1 mantenidas en cultivo. Esta línea celular proviene de un tumor de corteza adrenal de ratón y fue iniciada en 1964 (Yasumura y col., 1966). Estas son por lo tanto células adrenocorticales modificadas; no obstante, al igual que las células adrenocorticales normales, segregan esteroides en forma basal y en respuesta a la ACTH (Yasumura, 1966; Clark y Shay, 1981; Schimmer, 1981). Aunque nuestro estudio es el primero que se lleva a cabo sobre la electrofisiología de las células Y-1, esta línea celular ha sido ampliamente utilizada en investigaciones sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la biosíntesis y liberación de esteroides inducida por secretagogos (Yasumura, 1964; Mrotek y Hall, 1975 y 1977; Temple y Wolf, 1973; Clark y Shay, 1979 y 1981; Hall y col., 1981a; Mattson y Kowal, 1980 y 1982). La dotación celular originaria para el mantenimiento de la línea celular se obtuvo de American Cell Type Collection (número de catálogo CCL 79).

La morfología de las células Y-1 en cultivo varía con el grado de adhesión al sustrato. Varias horas después de sembradas la mayor parte de ellas aparecen redondeadas u ovoides, mientras que después de varios

días en cultivo la gran mayoría presentan forma fusiforme. El tamaño de estas células es de 12-15  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Los pases periódicos necesarios para el mantenimiento de la línea celular, así como la siembra de las células en placas de Petri para su utilización en los experimentos electrofisiológicos, se realizaron en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar. Los detalles metodológicos más importantes para el cultivo se exponen a continuación. Las células se sembraron en frascos planos tipo Costar de 75  $\text{cm}^2$  de superficie, utilizando como medio de cultivo Ham F-10 y como suplementos suero bovino fetal (5%) y penicilina-estreptomicina (2%). Se mantuvieron en una estufa a 37 °C durante 7 días, renovando el medio y los suplementos al 3-4 día, tiempo durante el cual las células crecieron y se multiplicaron hasta formar una monocapa casi completa. Al 7º día se procedió a la separación de las células y a su siembra en nuevos frascos de cultivo.

Para despegar las células del fondo del frasco y proceder a su separación, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 5 ml de una solución con 200 mg/l de tripsina y 500 mg/l de verseno (esta solución se calentó previamente a 37 °C, que es la temperatura óptima de actuación de la tripsina). El frasco se agitó suavemente con la solución durante aproximadamente 1 min.,

vaciándolo seguidamente para eliminar las células despegadas, que después de este tiempo eran las que se encontraban en peor estado. Se añadieron otros 5 ml de solución tripsina-verseno y, agitando suavemente, se esperó a que las células situadas en los márgenes del frasco empezaran a despegarse, eliminando entonces parte de la solución y dejando una pequeña cantidad para que siguiese actuando sobre las células y terminaran de despegarse. Posteriormente se añadió con una pipeta estéril 8-9 ml de medio de cultivo, haciendo pasar la suspensión resultante por la pipeta unas 20 veces a fin de dispersar mecánicamente las células. Posteriormente se añadió el medio de cultivo y los suplementos hasta completar 90 ml. Esta solución se repartió en tres frascos planos para su posterior incubación. Los frascos se identificaron con el número del pase y con la fecha del mismo. Las células así sembradas se mantuvieron en una estufa a 37 °C, repitiéndose todo el proceso cada 7 días.

Las células que iban a ser utilizadas para los registros electrofisiológicos se sembraron en discos de Petri de 35 mm de diámetro, aproximadamente 2 ml de suspensión por disco, y se mantuvieron hasta el momento de la realización del experimento en un incubador de CO<sub>2</sub> con ambiente húmedo y atmósfera compuesta de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a temperatura de 37 °C. Hemos comprobado que el periodo óptimo para registrar en células Y-1 es de 4 a 24 horas después de sembradas ya que durante este tiempo

la mayoría de ellas están suficientemente adheridas al fondo de la placa, requisito indispensable para poder penetrarlas con un microelectrodo (registro intracelular) o conseguir una resistencia de sello  $> 10^9 \Omega$  necesaria en los experimentos de "patch clamp" (véase más adelante).

## 2. Registro intracelular

La medida del potencial de membrana en reposo así como el análisis de las propiedades eléctricas pasivas y activas de las células Y-1 se han llevado a cabo mediante la técnica de registro intracelular con microelectrodos de vidrio. Se expone a continuación la metodología seguida para la realización de estos experimentos.

### 2.1. Soluciones

La composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de registro intracelular se muestra en la Tabla I. Normalmente, las células se mantuvieron en una solución estándar de composición iónica parecida a la del plasma (solución 2,7 K de la tabla I). Esta solución tiene un alto contenido en calcio (4 mM) porque parece favorecer el sellado de la membrana celular alrededor del microelectrodo. En algunos experimentos, y tras conseguir un registro estable del potencial de membrana, la solución estándar se sustituyó por otras de diferente composición iónica a fin de estudiar las permeabilidades iónicas de la membrana celular. Todas las soluciones se ajustaron a un pH de 7,35 y poseían una osmolaridad cercana a 300 mOsm/l.

TABLA I. Composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de registro intracelular.

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Ca	SO <sub>4</sub> Mg	Cl <sub>2</sub> Ba	Cl <sub>2</sub> Co	Tris†	Glucosa	Hepes
2,7K	140	2,7	4	1,1	-	-	-	5	10
2,4Co 2Ca	140	2,7	2	1,1	-	2,4	-	5	10
2,4Ba 0Ca	140	2,7	0	1,1	2,4	-	-	5	10
0Na 4Ca	0	2,7	4	1,1	-	-	140	5	-

†Tris: hidroximetilaminoetano (pH=7,4)

## 2.2. Microelectrodos

Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares de borosilicato (A-M System Inc., EE.UU.) con un estirador de micropipetas marca Narishige, modelo PE-2 (Japón). Los microelectrodos se llenaron con una solución 3 M acetato potásico y en algunas ocasiones 3 M cloruro potásico. Este proceso se realizó por capilaridad gracias a que el vidrio utilizado contiene un filamento adosado a su pared interna, lo que permite que el llenado de los microelectrodos se realice solo unos minutos antes de su utilización. La resistencia de los electrodos osciló entre 40 y 70 MΩ.



### 2.3. Electrónica

Para el registro intracelular en células Y-1 se utilizaron un amplificador y un generador de pulsos, ambos contruidos en nuestro laboratorio. Se describen a continuación las características más importantes de este equipo ya que su diseño y construcción ha sido en sí mismo uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo.

El diagrama de bloques del amplificador se presenta en la Figura 10. Básicamente está formado por una unidad situada junto a la preparación ("head stage") y por un cuerpo principal. El "head stage" se compone, a su vez, de un seguidor de voltaje y de un sistema de oscilación para la penetración de las células con el microelectrodo; el cuerpo principal de una fuente de inyección de corriente y de distintas etapas de acondicionamiento de la señal.

El seguidor de voltaje se montó en una caja metálica y se situó cerca de la preparación para así reducir el trayecto de alta impedancia, y por tanto la posibilidad de captar interferencias eléctricas, así como, para disminuir las capacidades de entrada al amplificador. La preparación y el "head stage" estaban incluidos en una jaula de Faraday conectada a tierra para aislar de interferencias la zona de registro.

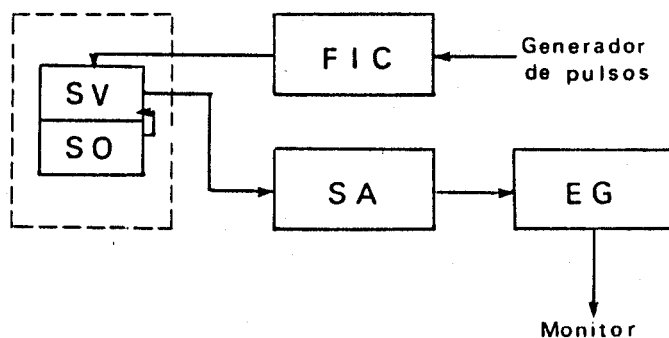


Figura 10. Diagrama en bloques del amplificador de registro intracelular. SV: seguidor de voltaje. SO: sistema de oscilación. FIC: fuente de inyección de corriente. SA: sistema de acondicionamiento de la señal. EG: etapas de ganancia.

Como seguidor de voltaje se utilizó un amplificador operacional FET 515 (Analog Devices, EE.UU.). Este amplificador tiene alta impedancia de entrada ( $>10^{13} \Omega$ ) y bajo ruido intrínseco por lo que es ideal para el registro intracelular. Su gran impedancia de entrada permite registrar fielmente el voltaje en la preparación ya que la caída de potencial debida a la resistencia del electrodo comparativamente es mucho menor. Además del seguidor de voltaje, el "head stage" consta de un circuito que produce una oscilación de frecuencia y duración variables y que lleva al seguidor de voltaje a la saturación. Este sistema, que se activa por control remoto para evitar todo contacto con la preparación, se utilizó para penetrar las células con el microelectrodo.

Un esquema simplificado del "head stage" se muestra en la Figura 11. Junto con el seguidor de voltaje (A9), se representa la parte del sistema de oscilación incluida en el mismo. Esta última está formada por un amplificador operacional (A8) cuya salida (C) puede conectarse a través de un pulsador (control manual) o un relé (control automático) situados en la unidad principal, a la malla del cable que va a la entrada del seguidor de voltaje (D) (ver figura) y que actúa como una placa de un condensador. Cuando el circuito se cierra se produce retroalimentación positiva de la señal y A9 entra en oscilación. En el modo automático el relé se controla con un pulso cuadrado de +5 V cuya duración variable se obtiene con un multivibrador (SN 74121).

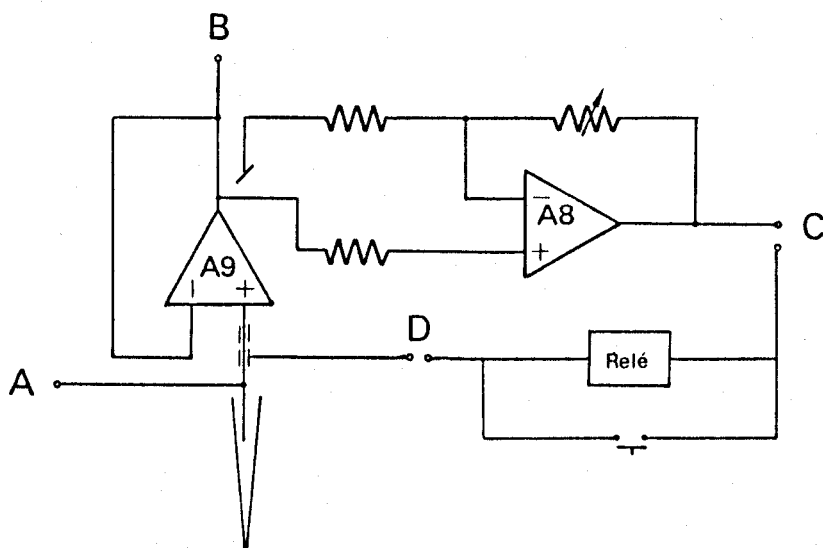


Figura 11. Esquema simplificado de la unidad situada en la proximidad de la preparación ("head stage"). A9: seguidor de voltaje. A8: amplificador para la retroalimentación positiva de A9. A: entrada para la inyección de corriente en la célula. B: potencial registrado por el seguidor de voltaje. C: salida de A8 para los sistemas que cierran el circuito en D. D: conexión con la malla del cable de registro.

El registro intracelular con electrodos de alta impedancia (40-70 M $\Omega$ ) requirió el acondicionamiento de la señal procedente del seguidor de voltaje a fin de compensar la resistancia del electrodo, en serie con la de la membrana, y la capacidad del mismo ya que ésta distorsiona la constante de tiempo de la señal biológica al actuar como filtro pasivo. La capacidad del electrodo resulta de la interposición de la pared de vidrio de la micropipeta (dieléctrico) entre dos soluciones conductoras. El acondicionamiento de la señal procedente del seguidor de voltaje se llevó a cabo mediante el circuito cuyo esquema básico aparece en la Figura 12.

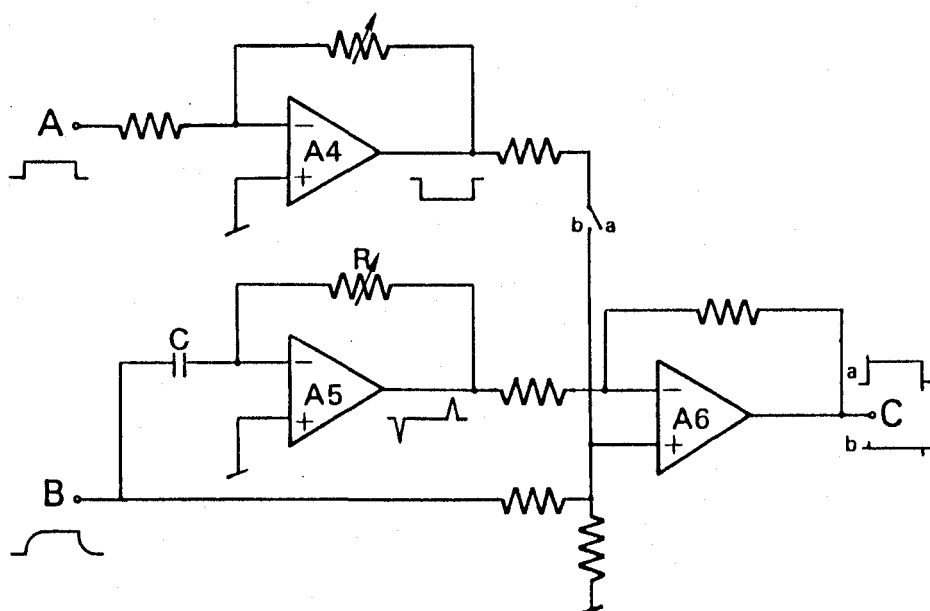


Figura 12. Esquema simplificado del sistema para acondicionar la señal registrada con el seguidor de voltaje. A: pulso que proviene del sistema de inyección de corriente. B: pulso proveniente del seguidor de voltaje. C: señal acondicionada (a: solo capacidad; b: capacidad y resistancia). A4: amplificador para la inversión del pulso en A. A5: diferenciador. A6: amplificador diferencial.

La diferencia de potencial debida a la resistencia del electrodo se compensó en la entrada positiva de un amplificador diferencial (A6 en la figura 12) sumando a la señal registrada por el seguidor de voltaje (B) otra señal de polaridad opuesta (generada en el amplificador A4) y de igual amplitud. La ganancia variable de este amplificador permitía ajustar la amplitud del pulso al valor adecuado para la compensación de la resistencia. La compensación de la capacidad del electrodo, junto con las que existen a la entrada del seguidor de voltaje, se llevó a cabo mediante un diferenciador (A5) de ganancia variable y un amplificador diferencial (A6). La señal procedente del seguidor de voltaje era sumada algebraicamente en A6 a su primera derivada invertida resultando de ello un pulso cuadrado. Tanto la resistencia como la capacidad del electrodo se compensaron antes de la penetración celular.

El amplificador diseñado, permite no solo registrar el potencial de membrana sino además inyectar corriente a través del microelectrodo mediante una bomba de corriente constante. Como se esquematiza en la Figura 13 este sistema está formado por 4 amplificadores operacionales, uno de ellos (A1) en lazo abierto para la inyección de corriente y el resto como circuito de retroalimentación para mantener el nivel de inyección constante; A2 y A9 son seguidores de voltaje entre cuyas patillas positivas hay colocada una resistencia

de  $100\text{ M}\Omega$  y tolerancia  $1\%$ , y A3 es un amplificador diferencial. Para un determinado valor de inyección de corriente, el potencial a ambos lados de la resistencia permanece también constante, sin embargo, cuando el voltaje en la pipeta varía esta diferencia de potencial se modifica, lo que es detectado por A1 que entonces restablece la diferencia de potencial inicial, y por tanto, la cantidad de corriente que pasa por la resistencia.

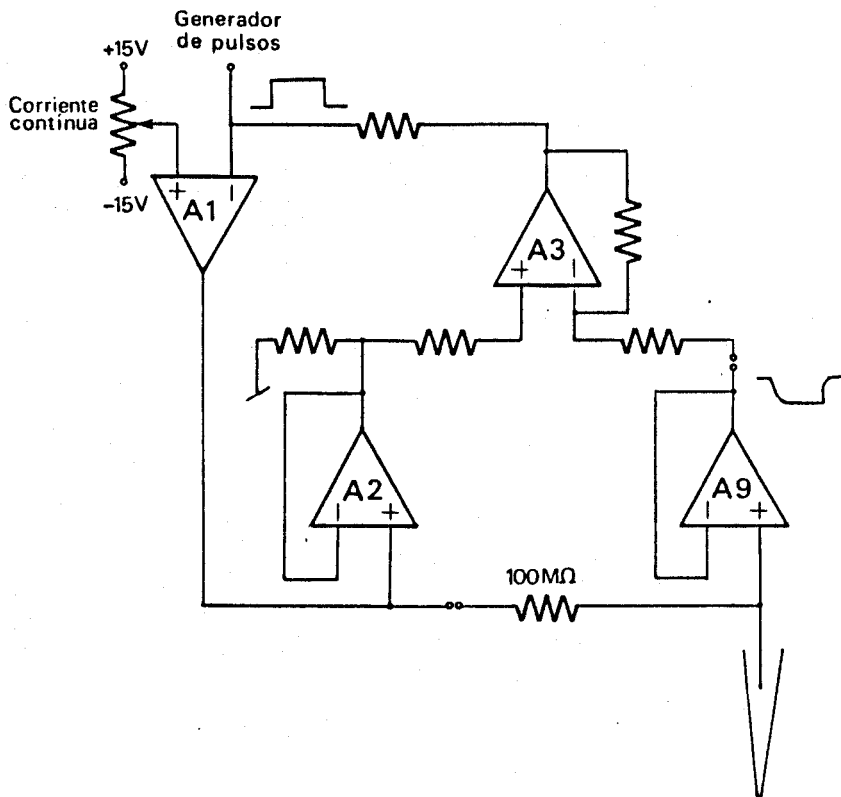


Figura 13. Fuente de inyección de corriente. A1: amplificador en lazo abierto para la inyección de corriente. A2 y A9: seguidores de voltaje. A3: amplificador diferencial.

La corriente que se inyecta en la célula puede tener forma de pulsos cuadrados o ser continua. En el primer caso, es necesario utilizar un generador de pulsos y conectar su salida con la patilla negativa del amplificador inyector de corriente (A1 en la Figura 13); en el segundo caso, inyección de corriente continua, la señal se obtiene al conectar la patilla positiva de A1 con  $\pm 15$  V a través de una resistencia variable.

El generador de pulsos utilizado para este fin se construyó fundamentalmente con electrónica digital. A continuación se describen someramente los tipos de circuitos integrados utilizados y las funciones que realizan en la generación del pulso. Un NE 555 (Signetics, EE.UU.) configurado como multivibrador se utilizó para generar el rango de frecuencias deseado; la salida de éste dispara un monoestable SN 74121 (Texas Instrumens, EE.UU.) que genera un pulso de duración variable y cuyo transiente final HI-LO se utiliza para disparar el siguiente SN 74121 (a1 y a2, respectivamente, en la Figura 14). La duración del pulso procedente de a1 se utiliza como retraso ("delay") entre el disparo del sistema de registro y el comienzo del pulso en a2. Este último pulso, también de duración variable, es el que aparece a la salida del generador y cuya amplitud se regula con un divisor de voltaje. El pulso puede invertirse con un amplificador operacional con ganancia unidad.

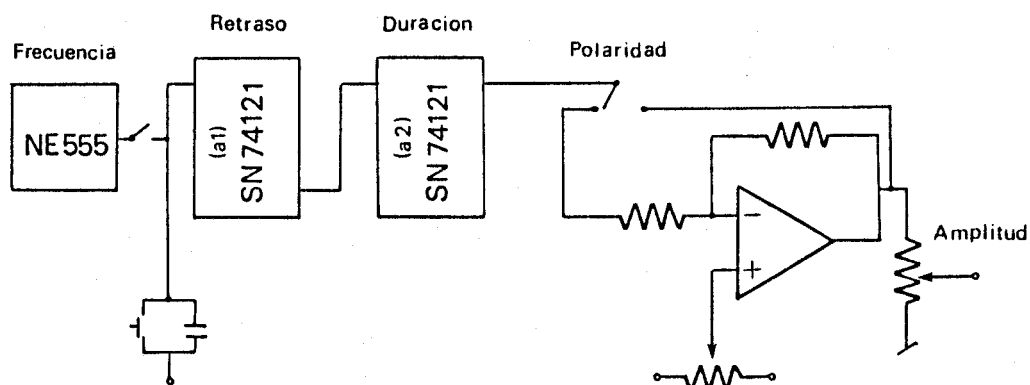


Figura 14. Esquema simplificado del generador de pulsos. La frecuencia puede establecerse automáticamente con un multivibrador (NE 555) o manualmente a través de un pulsador. Los monostables a1 y a2 proporcionan, respectivamente, el retraso ("delay") y la duración de la señal. Un amplificador operacional es utilizado para cambiar la polaridad y un divisor de voltaje para controlar la amplitud de la señal.

#### 2.4 Dispositivo experimental

Además de la instrumentación electrónica anteriormente descrita, para el registro intracelular se utilizó el material que se menciona a continuación.

Un micromanipulador hidráulico, marca Narishige, modelo MO-103R (Japón) que se utilizó para aproximar el electrodo de registro a la célula; este micromanipulador puede avanzar en las tres direcciones del espacio con una resolución de  $1\mu\text{m}$  y va montado sobre otro micromanipulador, también marca Narishige, modelo MM-33, de movimientos menos precisos que se utilizó para la colocación de la micropipeta sobre el disco de registro



y la introducción de la misma en la solución.

La aproximación de la micropipeta a la célula se controló visualmente con un microscopio invertido marca Nikon, modelo Diaphot (Japón) con óptica de Nomarski. Este microscopio está situado sobre una mesa antivibratoria construida en nuestro laboratorio. La mesa, formada por tres bloques de granito y una plancha de hierro, reposa en el suelo a través de unos contenedores con arena para reducir las vibraciones de alta frecuencia y posee cuatro cámaras de neumáticos bajo la plancha de hierro para absorber las vibraciones de baja frecuencia. Sobre la mesa se instaló una jaula de Faraday formada por un armazón metálico recubierto con una malla también metálica conectada a tierra para aislar la preparación de interferencias eléctricas.

Para el recambio de las soluciones en la placa de Petri se utilizó un sistema de perfusión muy simple compuesto por vasos para las distintas soluciones colocados a una altura superior a la de la preparación así como de tubos de conexión entre los reservorios y la placa de Petri. En este sistema, la solución fluye a la cámara de registro por gravedad y es recogida en un recipiente colocado a 1 m aproximadamente por debajo de ésta gracias a la presión negativa ejercida por la diferencia de altura.

Tanto el potencial de membrana como la corriente que se inyectaba a través del microelectrodo de registro, se

visualizaron en un osciloscopio de memoria marca Tektronix, serie 5000, (EE.UU.) y se almacenaron para su posterior análisis en una cinta magnética instrumental marca Hewlett Packard, modelo 3960 (EE.UU.).

Un esquema del dispositivo experimental empleado se muestra en la Figura 15.

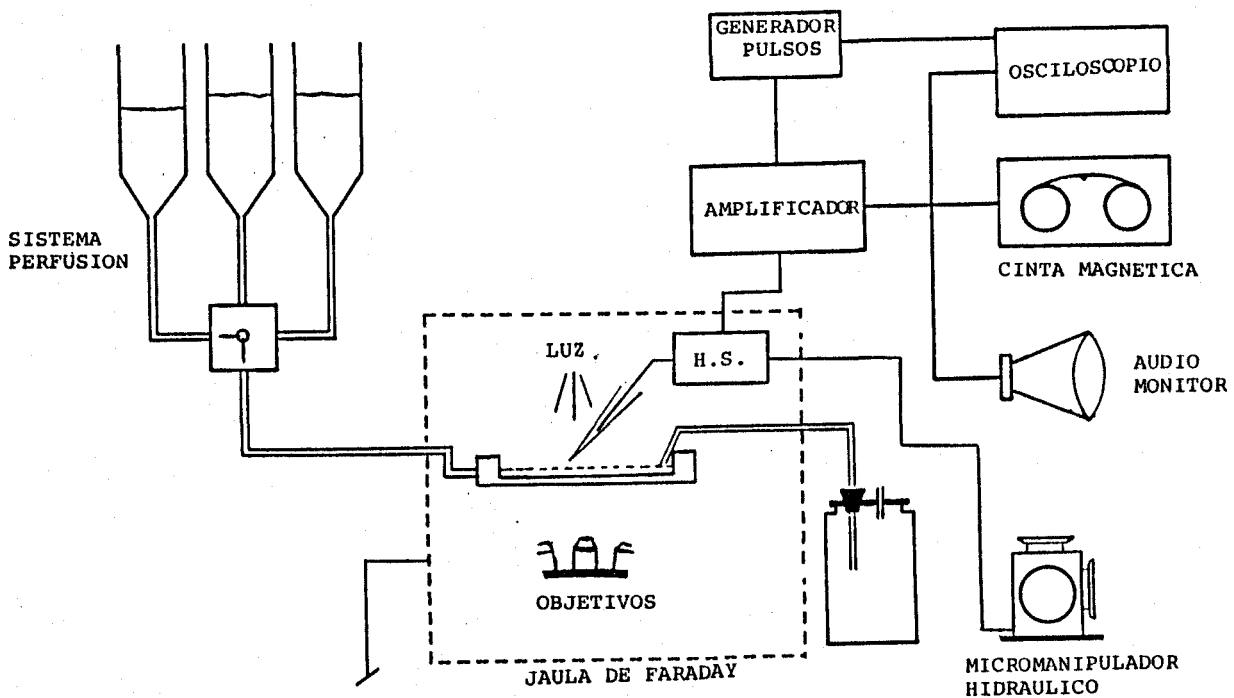


Figura 15: Esquema del dispositivo experimental.

## 2.5. Proceder experimental

Al comienzo de cada sesión experimental, el medio de cultivo de una placa de Petri se sustituyó por la solución de registro. Esta placa se situó sobre la platina del microscopio invertido quedando sujeta por la aposición de una pinza metálica. En contacto con la solución del baño se colocó un alambre de plata clorurada (Ag-AgCl) que actuaba como electrodo indiferente. La micropipeta se llenó con la solución conductora, 3M acetato potásico y en algunas ocasiones 3M cloruro potásico, y se montó sobre el micromanipulador por medio del cual se manejaba a distancia.

Antes de realizar un registro intracelular la resistencia del electrodo se calculó haciendo pasar por el mismo un pulso cuadrado de corriente de amplitud conocida y midiendo la caída de potencial que se produjo a su través. Posteriormente, se compensó esta caída de potencial con el sistema electrónico anteriormente descrito. Igualmente se compensaron los transientes de potencial debida a la corriente capacitativa generada por el condensador formado por la solución del baño y del electrodo con las paredes de vidrio de la micropipeta.

Una vez compensada la resistencia y capacidad del electrodo se aproximó la micropipeta a la célula mientras que se monitorizaba de forma continua su resistencia; la aproximación, que en un primer momento se controlaba

visualmente, se siguió posteriormente a través de la pantalla del osciloscopio. Cuando el microelectrodo estaba en la proximidad de la superficie de la célula se observaba un aumento de la resistencia debido a la oclusión parcial de la punta de la micropipeta (a veces con el microscopio es posible observar como la punta del microelectrodo deprime la superficie celular bajo su contacto). Para la penetración de la célula se utilizó el sistema de oscilación ya descrito.

Si el electrodo había penetrado la célula se observaba un cambio brusco en el nivel de dc voltaje debido a la diferencia de potencial existente a un lado y otro de la membrana celular. Durante los primeros momentos siguientes a la penetración, si el potencial registrado no era lo suficientemente negativo, se hacía pasar corriente negativa hasta alcanzar un potencial de membrana próximo a  $-70$  mV. Si la célula se recuperaba se interrumpía la inyección de corriente y se medía el potencial de membrana y otras características de tipo electrofisiológico. Las células que no se recuperaban a los 30-60 segundos tras la penetración fueron desechadas por considerarse dañadas.

### 3. Registro con la técnica de "patch clamp"

La identificación y cuantificación de las corrientes iónicas a través de un único canal en la membrana de células Y-1 se llevó a cabo con la técnica de "patch clamp". Los registros se realizaron en las configuraciones de "cell-attached" e "inside-out" según la técnica descrita por Hamill y col. (1981). En ambos casos el tamaño del área de membrana sobre la que se realizó el registro fue la aislada por la micropipeta, aproximadamente entre 2-3  $\mu\text{m}^2$ .

#### 3.1. Soluciones

La composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de registro con la técnica de "patch clamp" se muestran en la Tabla II. En un primer momento las células se mantuvieron en una solución de composición iónica parecida a la del plasma (solución 140  $\text{Na}^+$ , 2  $\text{Ca}^{2+}$ ) aunque durante el curso del experimento, y a fin de estudiar las propiedades de los canales en distintas condiciones iónicas, la solución inicial en contacto con la cara externa de la célula, o en el caso de registros en membranas escindidas con la cara interna de la membrana, se substituyó por otras de distinta composición iónica. Todas las soluciones se ajustaron a un pH de 7,35 y tenían una osmolaridad cercana a 300 mOsm/l. Antes de ser utilizadas, las soluciones se pasaron por un filtro Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ .

TABLA II. Composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de "patch clamp"

	ClNa	ClK	Cl <sub>2</sub> Ca	SO <sub>4</sub> Mg	Hepes
140Na, 2,7K	140	2,7	‡	2	10
140Na, 5K	140	5	‡	2	10
10Na, 130K	10	130	‡	2	10

‡ Las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en estas soluciones fueron: 2 mM, 1 mM, 50  $\mu$ M, 2-3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 0,01  $\mu$ M. En las soluciones sin Ca<sup>2+</sup> añadido se estimó una concentración de Ca<sup>2+</sup> iónico de 2-3  $\mu$ M. Para la obtención de soluciones con 1 y 0,01  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> se utilizó EGTA (ácido tetracético N-N' etilenglicol-bis-( $\beta$ -amino-etil eter)) y Ca<sup>2+</sup> (según Barrett y col., 1982).

### 3.2. Micropipetas

Para la fabricación de las micropipetas se utilizó vidrio blando (bajo punto de fusión), similar al que se usa para la determinación del hematócrito (Hirschmann, RFA), de 1,5-1,6 mm de diámetro externo y 1,1-1,2 diámetro interno. La técnica seguida para la fabricación de los electrodos es similar a la descrita previamente por Hamill y col. (1981); los detalles más importantes de la misma se exponen a continuación.

La fabricación de los electrodos se llevó a cabo en dos fases, estirado del vidrio y pulido de la punta. El estirado del vidrio se realizó con un estirador vertical, marca David Kopf Instruments, modelo 700 D,

EE.UU, en dos etapas sucesivas. En la primera se estira de 7-10 mm la parte central para conseguir un diámetro interno de unas 200  $\mu\text{m}$ , para ello se hace pasar por la resistencia que calienta el vidrio una corriente de 19 A y se coloca un tope en la columna de tracción que limita la elongación al valor deseado. En la segunda, se vuelve a centrar el vidrio y se hace pasar por la resistencia una corriente de 13-14 A; en esta etapa, debido a que pequeñas variaciones en la cantidad de calor desprendido dan lugar a grandes desviaciones del diámetro de la punta, la intensidad de la corriente se controló midiendo la diferencia de potencial entre los extremos de la resistencia mediante un polímetro digital, de mayor sensibilidad que el amperímetro del estirador, de forma que valores comprendidos entre 1,45 y 1,46 V se correspondían con los diámetros deseados (véase más adelante).

La segunda fase en la fabricación de las micropipetas, el pulido de la punta, tiene como finalidad, además de reducir el diámetro de la misma, conseguir que la superficie de la micropipeta que va a contactar con la célula sea lisa y regular y se evite con ello que el electrodo dañe la membrana y se favorezca la formación de sellos de resistencia mayor de  $10^9 \Omega$ .

El pulido de las micropipetas se llevó a cabo con una microforja fabricada en nuestro laboratorio. Esta

consta de un filamento de platino-10% iridio, de 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, dispuesto en V sobre un soporte colocado en la platina de un microscopio y de una fuente de voltaje constante para alimentar éste último. Para realizar el pulido se coloca la micropipeta sobre otro soporte en la platina del microscopio, con la punta enfrentada al vértice del filamento, y se hace pasar una corriente por éste. En nuestro caso la distancia entre el filamento y la punta, así como el tiempo de exposición, oscilaron entre 15-30  $\mu\text{m}$  y 5 y 10 s, respectivamente, dependiendo de la cantidad de corriente aplicada. En las pipetas así pulidas las puntas tienen un diámetro entre 0,25 y 1  $\mu\text{m}$ , que se corresponde con un área media de apertura de aproximadamente 1  $\text{m}\mu^2$  (véase Figura 16).

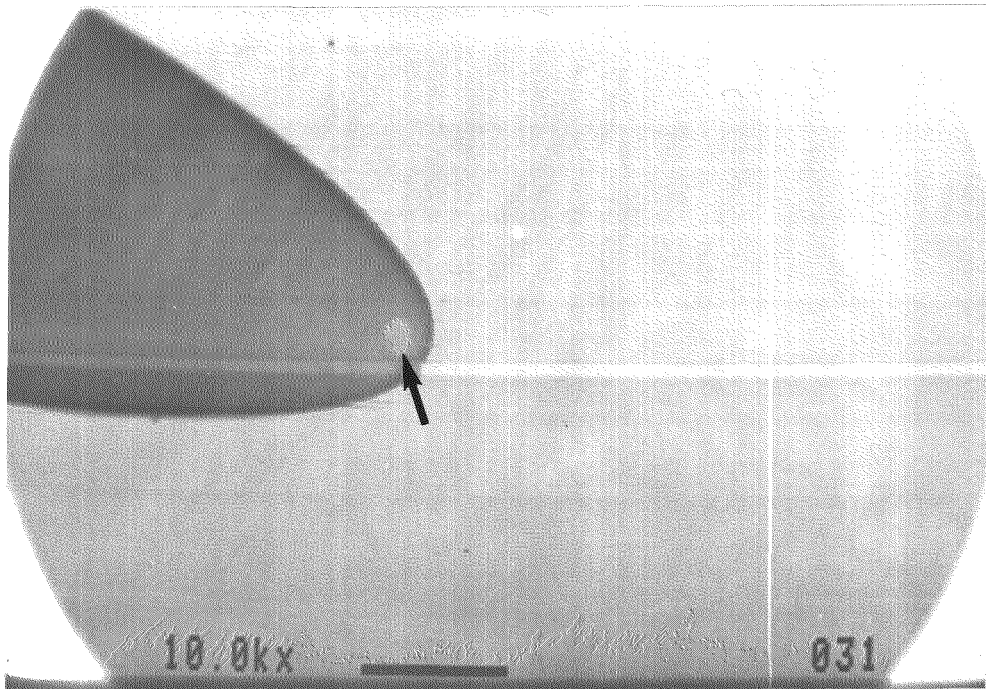


Figura 16: Punta de una de las micropipetas utilizadas. El diámetro de la apertura es de 0,25  $\mu\text{m}$  después de la metalización (barra de calibración 1  $\mu\text{m}$ ). Microscopio electrónico de de barrido. Cortesía del Dr. Ambrosiani.



Como sistema de control en la fabricación de los electrodos, antes y después de pulir las micropipetas se midió de forma indirecta el diámetro de la punta. Haciendo pasar aire con una jeringa a través de la micropipeta en un medio de acetona o alcohol, y midiendo el volumen de aire que es necesario comprimir hasta que empiezan a salir las primeras burbujas, se puede obtener un valor indirecto del diámetro de ésta. En nuestros experimentos los electrodos antes de ser pulidos tenían un "bubble number" de 6 (este número representa los ml de aire en que quedan comprimidos los 10 iniciales) y después de pulidos entre 3,5 y 4; estos valores se correspondían posteriormente, en electrodos llenos con una solución iónica de 300 mOsm/l, con una resistencia eléctrica entre 3-6 M $\Omega$ . En la Tabla III se representa una muestra de las mediciones de los electrodos durante su fabricación, los valores correspondientes de resistencia eléctrica y el resultado obtenido con ellos en el intento de hacer sello en una célula durante un experimento típico.

### 3.3. Electrónica

El registro de las corrientes a través de los canales iónicos de la membrana de células Y-1, se llevó a cabo con un amplificador y un generador de pulsos contruidos a tal efecto en nuestro laboratorio. El generador de pulsos es similar al descrito anteriormente en el apartado 2.3. y por tanto solo se describe en

TABLA III. Control de electrodos.

N	V	BNA	BND	$R_{inicial}$ (M $\Omega$ )	$R_{final}$ (G $\Omega$ )
1	1,4	6	3,5	3,5	SI
2	"	"	4	3	—
3	"	"	4	2,5	SI
4	"	"	3,5	2,5	SI
5	"	"	3,5	3	SI
6	"	"	4	3	—
7	"	"	3	3,5	SI
8	"	"	3,7	3,5	SI
	$\bar{x}=1,42\pm 0$	$\bar{x}=6\pm 0$	$\bar{x}=3,65\pm 0,32$	$\bar{x}=3,06\pm 0,39$	

N: electrodos. V: diferencia de potencial entre los extremos de la resistencia del estirador en la segunda fase. BNA: "bubble number" antes de pulir. BND: "bubble number" después de pulir.  $R_{inicial}$ : resistencia del elctrodo.  $R_{final}$ : resistencia tras la succión. En la parte inferior de la tabla se expresa la media  $\pm$  D.E.

este apartado las características generales del amplificador de "patch clamp".

Este amplificador posee un nivel de ruido intrínseco pico a pico de 0,2 pA por lo que se pueden registrar con facilidad corrientes entre a 0,5-6 pA, que son las que resultan del paso de iones a través de un solo canal. La corriente captada por el electrodo se registró por medio de un convertidor corriente-voltaje (I/V) situado cerca de la preparación ("head stage"), siendo la señal posteriormente acoplada y amplificada en las distintas unidades del amplificador (amplificación máxima, 0,4 V/pA aproximadamente). El potencial de membrana en

el área aislada por la pipeta se controló mediante el dispositivo que se describe más adelante. En la Figura 17 se representa un diagrama de bloques del sistema de registro, el cual se basa en el diseño de Sigworth (1983).

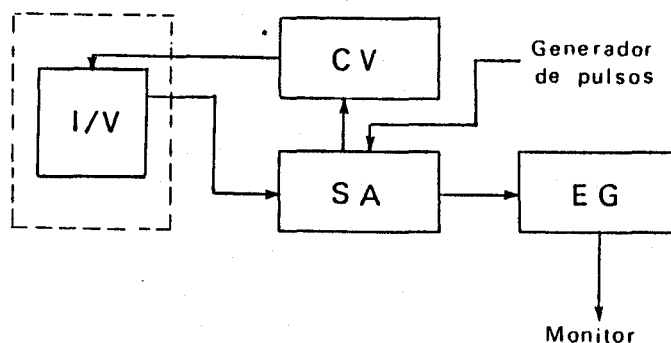


Figura 17. Diagrama en bloques del amplificador de "patch clamp". I/V: convertidor corriente-voltaje. CV: control de voltaje. SA: sistema de acondicionamiento de la señal. EG: etapas de ganancia.

Como convertidor I/V (Figura 18) se utilizó un amplificador operacional BB 3523 (Burr-Brown Research Corp., EE.UU) que se montó en una caja metálica y se situó cerca de la preparación ("head stage"). Este amplificador se configuró con una resistencia de retroalimentación ( $R_r$ ) de  $8,5 \text{ G}\Omega$  (ganancia  $8,5 \text{ mV/pA}$ ) que es un valor adecuado para registrar corrientes del orden de picoamperios. La corriente debida al del paso de iones a través de los canales en la zona de la membrana

sellada por el electrodo es captada por éste y al llegar al punto suma del convertidor I/V (B en la figura), da lugar a la modificación del voltaje en este punto (voltaje virtual de referencia) generando entonces el convertidor una corriente de la misma amplitud pero de signo opuesto para anular esta variación; el paso de esta corriente a través de  $R_r$  da lugar a una modificación del potencial a la salida del convertidor ( $V_s$ ) que se utiliza para calcular el valor de la corriente según la fórmula (1).

$$i = \frac{V_s}{R_r} \quad (1)$$

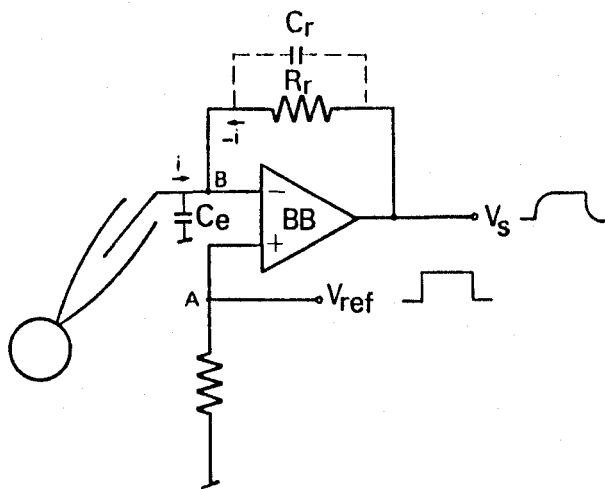


Figura 18. Convertidor I/V.  $R_r$ : resistencia de retroalimentación.  $C_r$ : componente capacitivo de la resistencia de alimentación.  $C_e$ : capacidad a la entrada del amplificador.  $V_{ref}$  (A): voltaje de referencia. B: voltaje virtual de referencia.  $V_s$ : voltaje a la salida del convertidor.

Además de la utilización como convertidor I/V de un amplificador con bajo ruido intrínseco y de configurar éste con una  $R_r$  de alto valor para aumentar la ganancia de la señal, la resolución de las corrientes que resultan del paso de iones a través de un canal mejora cuando la resistencia entre la entrada del amplificador y tierra es alta, de forma que, el establecimiento de un sello entre un área de la membrana de la célula y el electrodo con una resistencia  $> 10^9 \Omega$  da lugar a que el ruido del sistema de registro disminuya en un orden de magnitud.

En la parte A de la Figura 19, se representa un esquema de la situación del electrodo de registro sobre la superficie de una célula sobre la que se ha hecho un sello y, en B, se muestra el circuito eléctrico equivalente de la zona de registro; cuando  $R_s$  es  $> 10^9 \Omega$  la corriente a través del parche de membrana sellado por el electrodo ( $i_p$ ) es captada por éste en su totalidad ya que el flujo de iones a la solución del baño a través de  $R_s$  es prácticamente nulo; por otra parte, las corrientes del resto de la membrana y del baño afectan en poca medida al registro en el parche de membrana aislado por el electrodo cuando la  $R_s$  alcanza el valor señalado.

El mismo amplificador utilizado como convertidor I/V se utiliza también para controlar el potencial en el área de membrana aislada por la pipeta y modificarlo a voluntad en la dirección de despolarización e hiperpolarización. El voltaje de referencia ( $V_{ref}$ ) se aplica en la patilla

A



B

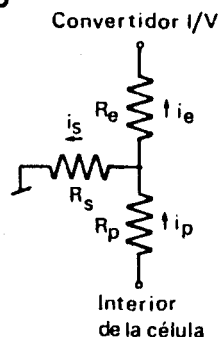


Figura 19. A. esquema de la posición del electrodo sobre la membrana de una célula sobre la que se ha hecho un sello. B. circuito equivalente de la membrana en la zona de registro.  $R_p$ : resistencia del parche de membrana.  $R_s$ : resistencia del sello.  $R_e$ : resistencia del electrodo.  $i_p$ : corriente a través del parche de membrana sellado por el electrodo.  $i_s$ : corriente a través del sello.  $i_e$ : corriente a través del electrodo.

positiva del amplificador, el cual genera una corriente a través de  $R_r$  que sitúa al mismo potencial la entrada negativa del amplificador y, por lo tanto, también al electrodo (ver Figura 18). Para poder variar el potencial en la pipeta en un amplio rango ( $\approx 150$  mV) la resistencia de sello debe ser del orden de gigaohmios para que la ganancia del amplificador actuando como seguidor de voltaje sea pequeña y éste no llegue a la saturación. De la fórmula que expresa el voltaje de salida ( $V_s$ ) en un seguidor de voltaje (2) se desprende que si  $R_s \ll R_r$  el amplificador puede saturarse ya que en ese caso  $V_s$  tiende a infinito; por el contrario, a mayor valor de  $R_s$  menores serán las variaciones de  $V_s$  debidas al cambio de potencial en la pipeta.

$$V_s = V_{ref} \left( 1 + \frac{R_r}{R_s} \right) \quad (2)$$

Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación de pulsos cuadrados o un nivel constante de potencial a la entrada positiva del convertidor I/V, hace que éste genere la corriente necesaria para situar la pipeta al voltaje de referencia. Debido a la capacidad de la pipeta ( $C_p$ ) y al resto de las capacidades a la entrada del convertidor I/V esta corriente alcanza a veces al comienzo del pulso valores transientes del orden de nA lo cual puede distorsionar la corriente que se pretende registrar y, en algunas ocasiones, llevar al convertidor a la saturación. Para reducir estas últimas se conecta la caja metálica que contiene el convertidor y los micromanipuladores (mayores responsables de estas capacidades) a  $V_{ref}$ . La compensación de  $C_p$  se lleva a cabo suministrando una corriente a través de un circuito en el que no interviene el convertidor para cargar  $C_p$  (Figura 20). Este circuito está formado por un condensador de pequeño valor (aprox. 1 pF) conectado por un lado al electrodo y por otro a la salida de un amplificador operacional de ganancia variable (A6) cuya entrada se conecta a  $V_{ref}$ . La compensación de la  $C_p$  se lleva a cabo monitorizando el potencial a la salida del convertidor I/V y modificando la ganancia de A6 hasta observar la desaparición del transiente capacitativo.

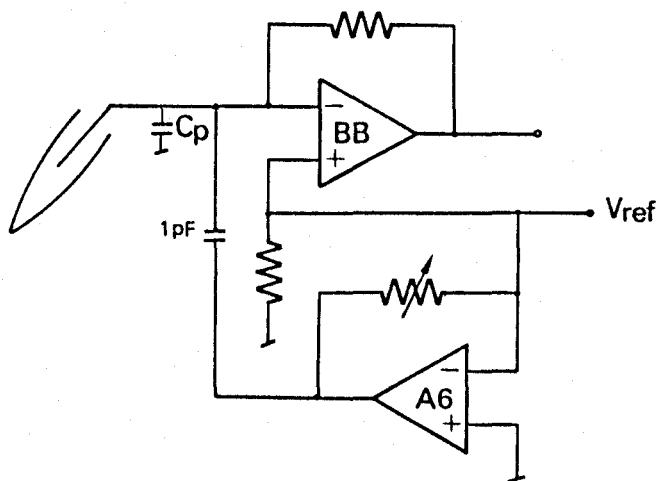


Figura 20. Esquema básico del circuito utilizado para compensar la capacidad de la pipeta. A6: amplificador de ganancia variable para ajustar la amplitud de la corriente necesaria para cargar el condensador de la pipeta. Cp: capacidad de la pipeta.

La resistencia de retroalimentación del convertidor I/V posee un componente capacitativo apreciable (aproximadamente 0,1 pF), que sumado al resto de las capacidades a la entrada del amplificador hace que la señal a la salida del convertidor aparezca con una constante de tiempo de casi 1 ms (véase Figura 18). Esto no afecta al registro de las señales más lentas pero da lugar a que las señales de menos de 4-5 ms de duración aparezcan filtradas ( $f_c: 187$  Hz). Para mejorar la respuesta de frecuencia el amplificador dispone de un circuito (Figura 21 A) formado por un amplificador operacional (A5) configurado con una



resistencia y un condensador en serie conectados a su punto suma (B); este amplificador realiza la operación inversa a la filtración, suma a la señal de salida del convertidor I/V (A) su primera derivada, obteniéndose entonces una señal cuadrada (C). El valor de la constante de tiempo (RC) del sistema de compensación de la respuesta de frecuencia se ajusta (Figura 21 B) aplicando a través de un condensador un tren de pulsos en diente de sierra a la entrada negativa del convertidor para obtener la primera derivada como una serie de pulsos cuadrados; esta señal que aparece filtrada a la salida del convertidor debe aparecer posteriormente cuadrada si el sistema de corrección está ajustado.

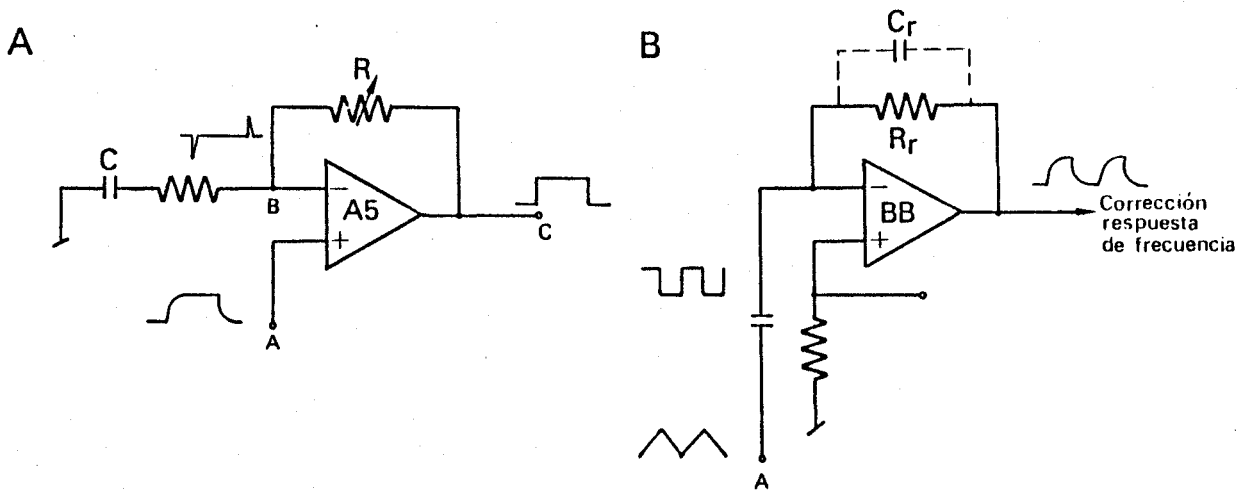


Figura 21. A. esquema del circuito empleado para mejorar la respuesta de frecuencia del convertidor I/V. B. convertidor I/V con el sistema empleado para ajustar la compensación.

El generador de pulsos empleado en los experimentos de "patch clamp" es similar al utilizado para el registro intracelular previamente descrito. La amplitud de los pulsos a la salida del generador empleados para este tipo de experimentos varió entre 0,1 y 2 V; 10 veces mayor que los pulsos que se aplicaron a la zona de membrana bajo registro (10 a 200 mV), ya que en el amplificador la señal procedente del generador de pulsos se divide por 10 a fin de dividir por este mismo valor el ruido.

#### 3.4. Dispositivo experimental

Con excepción de la microforja y el portaelectrodo, el resto del dispositivo experimental utilizado para la realización de la técnica de "patch clamp" es básicamente el mismo que el empleado para el registro intracelular (mesa antivibratoria, jaula de Faraday, microscopio invertido, micromanipuladores, sistema de perfusión, osciloscopio y cinta magnética instrumental), previamente descritos en el apartado 2.4. La microforja ha sido tratada también en un apartado anterior, por lo que en éste solo se describirá el portaelectrodo.

El portaelectrodo, fabricado con material de Teflón, posee en uno de sus extremos un ajustador para sujetar firmemente la pipeta; ésta va introducida en una cavidad que comunica con el exterior a través de una apertura lateral a la que va conectada un tubo de polietileno por el que el experimentador aplica succión o ejerce presión positiva en el interior del electrodo. El extremo opuesto

del portaelectrodo lleva un conector tipo BNC al que va soldado un hilo de plata (Ag-AgCl) y por el que se une eléctricamente la solución del electrodo con la entrada del convertidor I/V (véase Figura 22).

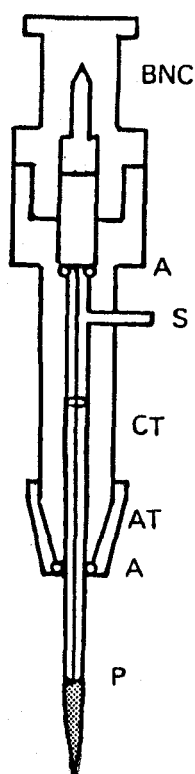


Figura 22: Sección longitudinal del portaelectrodo. BNC: conector que une la solución de la pipeta a través de un hilo de plata (Ag-AgCl) con el convertidor I/V. A: gomas de ajuste. S: salida o conexión de la cavidad central con el exterior y a la que va acoplado un tubo de polietileno por el que se puede ejercer presión positiva o negativa. CT: cuerpo de teflón. AT: ajustador de teflón. P: pipeta.

### 3.5. Proceder experimental

Las células se mantuvieron en el incubador de  $\text{CO}_2$  hasta momentos antes de empezar los experimentos. Al iniciarse éstos el medio de cultivo se sustituyó por la solución de registro ( $140 \text{ Na}^+$ ,  $2\text{Ca}^{2+}$  en tabla II); esta solución, así como las que se usaron con posterioridad a lo largo del experimento, se pasaron por un filtro Millipore de  $0,22 \mu\text{m}$  ya que es crítico para la formación de sellos de alta resistencia que no se adhiriera ninguna partícula de polvo a la punta de la pipeta.

La placa de cultivo se situó sobre la platina del microscopio invertido quedando sujeta por la aposición de una pinza metálica. En contacto con la solución del baño se colocó el electrodo indiferente, consistente en un hilo de plata ( $\text{Ag-AgCl}$ ), que conectaba ésta con tierra.

Las micropipetas se llenaron aproximadamente 1 cm con las soluciones que se especifican en la tabla II, primero introduciendo la punta en la solución y aspirado con una jeringa, y luego, completando el llenado por la parte posterior. Una vez que se comprobó con un microscopio el llenado correcto de la pipeta, se colocó ésta en el portaelectrodo, de manera que el alambre de plata conectado al BNC del mismo (ver Figura 22) contactara con la solución de la pipeta y se fijó firmemente al portaelectrodo, no existiendo entonces por su parte posterior otra comunicación con el exterior sino la del tubo de succión. A continuación, se situó la

micropipeta sobre la placa de cultivo y por medio del micromanipulador se introdujo en la solución mientras que a través del tubo de polietileno se aplicó presión positiva ( $\approx 10$  cm H<sub>2</sub>O) para evitar que al entrar en ésta pudieran adherirse impurezas a la punta.

Al introducir la micropipeta en la solución, se observó un cambio en el nivel de corriente debido al potencial de unión ("junction potential") que se establecía entre la solución de la micropipeta y la del baño (potencial líquido-líquido) y entre la solución del baño y el electrodo indiferente (potencial líquido-metal); esta corriente se anuló variando el potencial en la pipeta, generalmente de 2-6 mV.

La resistencia del electrodo se midió con éste en el baño, antes de comenzar la aproximación de la pipeta a una célula. Para calcular su valor, se aplicó un pulso cuadrado de pequeña amplitud (0,6 mV) a la entrada positiva del amplificador BB ( $V_{ref}$ ) y se midió el valor del voltaje a la salida de este amplificador ( $V_s$ ) (resultado de la caída de potencial a través de dos resistencias en serie, la del electrodo ( $R_e$ ) y la de retroalimentación del propio amplificador ( $R_r$ )). En esta situación el amplificador BB actúa como un seguidor de voltaje con ganancia, por tanto, de la fórmula que expresa el voltaje a la salida de un amplificador en esta configuración (2) se dedujo en valor de la resistencia del electrodo (3).

$$R_e = \frac{V_e R_r}{V_s - V_e} \quad (3)$$

Una vez conocida la resistencia, el electrodo se aproximó a la célula por medio del micromanipulador hidráulico. En un primer momento la aproximación se controló a través del microscopio y una vez cerca de la membrana por la monitorización continua de la resistencia del electrodo. Cerca de la superficie de la célula se observó un aumento de resistencia, dejándose entonces de aplicar presión positiva y continuando lentamente la aproximación hasta que la resistencia alcanzó 50-100 M $\Omega$ , momento en que se aplicó una succión suave (20-30 cm de H<sub>2</sub>O) a fin de sellar el electrodo sobre la membrana de la célula. Al obtener un gigasello se observó un cambio brusco del valor de la resistencia, ya que éste es un fenómeno todo o nada. En la Figura 23 se ha representado la monitorización de la resistencia del electrodo durante este proceso: primero en la solución del baño, luego en la proximidad de la superficie de una célula y, finalmente, tras haber aplicado la succión y haberse formado un gigasello. Obsérvese en la figura como la amplitud de la corriente disminuye progresivamente a medida que la resistencia aumenta y como el ruido de base disminuye

significativamente cuando se forma el gigasello. Una vez formado el sello, este permaneció al dejar de hacer succión.

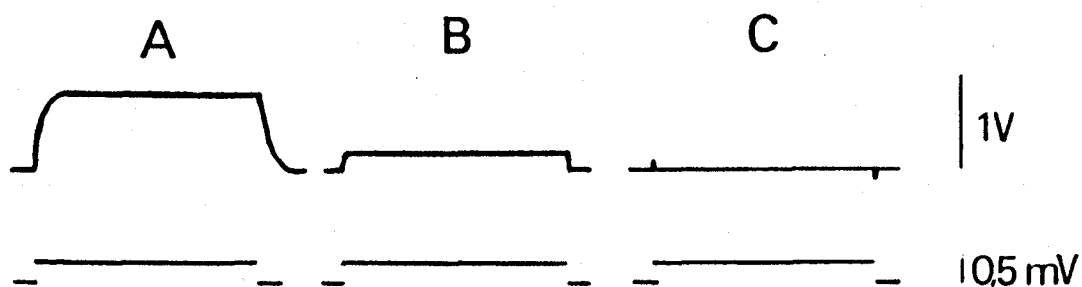


Figura 23: Monitorización de la resistencia del electrodo (parte superior de la figura) durante la formación de un gigasello. A) electrodo en el baño. B) idem en contacto con la superficie de la célula. C) resistencia alcanzada después de la succión. En la parte inferior de la figura aparecen la diferencia de potencial aplicada para monitorizar la resistencia.

Debido a las fuerzas de unión que se establecen entre el vidrio de la pipeta y la membrana de la célula una vez formado el gigasello (Corey y Stevens, 1983), si se retira el electrodo de la célula el sello permanece mientras que la membrana que sufre la tracción termina por romperse. En un alto porcentaje de casos, al retirar la pipeta de la célula los extremos de la membrana se unen y forman una vesícula en la punta de la pipeta. La vesícula en sí no tiene interés para el registro ya que la cara externa de la membrana puede estar bañada al mismo tiempo por la solución de la micropipeta y la del baño, lo que hace difícil la interpretación

del registro. La vesícula se rompió sacando la pipeta del baño y exponiéndola al aire durante 1-2 segundos.

En la configuración de "cell-attached" el registro de la corriente a través de los canales incluidos en el área de membrana sellada por el electrodo, se realiza manteniendo la integridad celular (Figura 24). En esta configuración se asume que el voltaje en el lado interno de la membrana es mantenido constante por el potencial de membrana del resto de la célula (Fenwick y col., 1982a). La variación del potencial en el parche de membrana sellado se lleva a cabo modificando el voltaje en el interior de la pipeta, de forma que cuando ésta se hace positiva con respecto a tierra se está hiperpolarizando sobre el potencial de membrana y, cuando se hace negativa se obtiene una despolarización sobre el mismo.

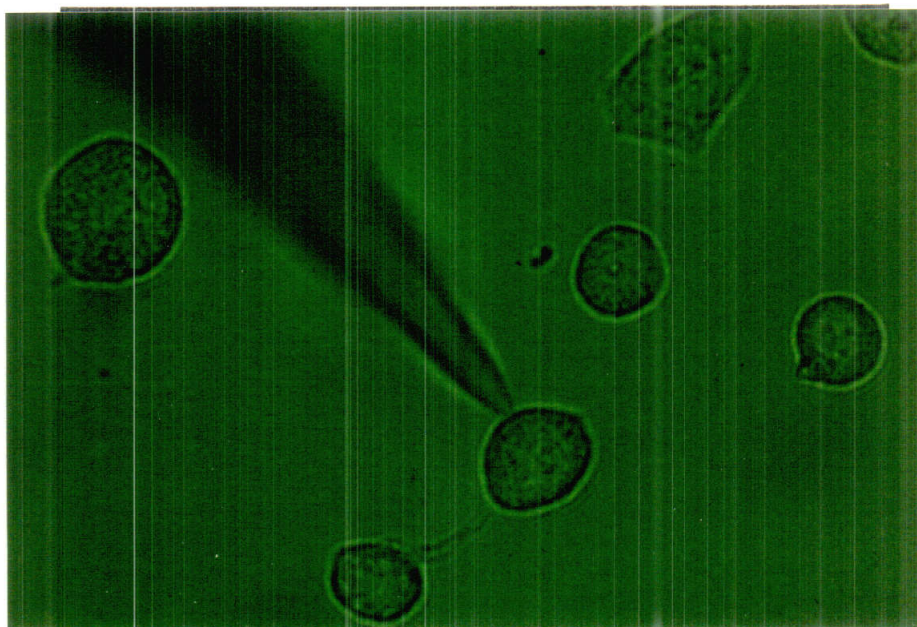


Figura 24. Micrografía de una pipeta en contacto con la superficie de la membrana de una célula Y-1. De la aplicación de presión negativa al interior de la pipeta resulta el establecimiento de un gigasello que permite registrar la corriente iónica transmembrana en el microárea sellado por el electrodo. Configuración de "cell-attached". Tamaño de la célula en contacto con el electrodo: 12  $\mu$ m. (Optica de Normarski).



En la configuración "inside-out" el registro se realiza sobre un área de membrana escindido del resto de la célula y la cara interna de la membrana está en contacto con la solución del baño. En esta configuración el potencial en este lado de la membrana es mantenido al mismo nivel que tierra por el electrodo indiferente y el voltaje en la cara externa de la membrana es el aplicado en la pipeta, que en el caso de que sea más positivo que tierra da lugar a una hiperpolarización sobre el nivel cero y a una despolarización si se hace más negativo.

#### 4. Análisis de los datos

Las señales de corriente y voltaje se almacenaron en la cinta magnética instrumental para su posterior análisis. Este se realizó generalmente sobre la pantalla del osciloscopio de memoria, o bien, sobre una reproducción fotográfica del contenido de la misma. Los parámetros electrofisiológicos estudiados en los experimentos de registro intracelular fueron:

-potencial de membrana; se consideraron solo los potenciales  $> -50$  mV y que permanecieron constantes al menos durante 2-4 minutos

-resistencia de entrada; se midió con pulsos de corriente negativa  $< 0,5$  nA. Los valores de potencial obtenidos, junto con los de la corriente, se representaron gráficamente de forma automática mediante un ordenador IBM PC calculándose al mismo tiempo la pendiente de la recta

que resultó de ajustar linealmente estos puntos (correspondiente a la resistencia de entrada) y el coeficiente de correlación.

-constante de tiempo

-amplitud y duración de los potenciales de acción

-velocidad de subida y bajada de los potenciales de acción. Este parámetro se calculó a partir de la primera derivada con respecto al tiempo de la señal de voltaje.

La primera derivada se obtuvo con un diferenciador analógico construido en nuestro laboratorio. Mediante la medida de  $dV/dt$  se realizó una estimación de la corriente iónica según la fórmula:

$$i = -C \cdot dV/dt.$$

Los registros de los experimentos de "patch clamp" se almacenaron así mismo en cinta magnética para su posterior análisis. Este se realizó sobre la pantalla del osciloscopio de memoria o bien tras su reproducción en un inscriptor de papel (San-ei, mod. BK31, Japón). La amplitud de la corriente a través de un canal se midió de forma manual y la conductancia se calculó mediante la representación gráfica de las curvas  $I/V$  de forma automatizada. La probabilidad de un canal de estar abierto  $P(a)$  se determinó manualmente sumando todos los intervalos de tiempo en que el canal se encontró en ese estado y dividiéndolos por el tiempo total del registro analizado.

## RESULTADOS

### 1. Registro intracelular. Potenciales de acción de calcio

Los datos que se muestran en este apartado se obtuvieron de 63 células adrenocorticales en las que se realizó un registro intracelular estable. Con esta técnica se han estudiado las propiedades eléctricas pasivas y activas de la membrana así como las conductancias iónicas responsables de las mismas.

#### 1.1 Constantes eléctricas pasivas

Los valores de las constantes eléctricas pasivas de 12 células adrenocorticales representativas se muestran en la Tabla IV. El potencial de membrana de las células Y-1, registrado en la solución estándar fue de  $-68 \pm 12,9$  mV (media  $\pm$  D.E.,  $n=63$ ). La resistencia de entrada, calculada en base al cambio de potencial obtenido al inyectar pulsos negativos de corriente inferiores a 0,5 nA, fue de  $39,6 \pm 13,2$  M $\Omega$  ( $n=10$ ) y la constante de tiempo ( $\tau$ ), de  $3,8 \pm 1,3$  ms ( $n=11$ ).

Las características eléctricas de la membrana se estudiaron mediante la inyección de pulsos cuadrados de corriente a través del electrodo de registro. La inyección de corriente produjo cambios pasivos del potencial de membrana cuya amplitud dependió de la cantidad de corriente inyectada. En todas las células registradas despolarizaciones a partir de un cierto valor umbral dieron lugar a la generación de potenciales de acción. En la Figura 25 se muestra un ejemplo de la respuesta

Tabla IV. Constantes eléctricas pasivas y activas de 12 células adrenocorticales representativas. P.M.: potencial de membrana. R.E.: resistencia de entrada.  $\tau$ : constante de tiempo. ampl., umbr. y dur.: amplitud, umbral y duración de los potenciales de acción.  $dV/dt_s$  y  $dV/dt_b$ : primera derivada del potencial de membrana durante la fase de subida y bajada del potencial de acción.

Cel.	P.M. (mV)	R.E. (M $\Omega$ )	$\tau$ (ms)	ampl. (mV)	umb. (mV)	dur. (ms)	$dV/dt_s$ (V/s)	$dV/dt_b$ (V/s)
1	65	65	5,2	70	50	-	-	-
4	70	46	4,3	70	55	10-30	10	27
5	85	35	4,0	120	65	15-150	30	63
6	65	-	-	85	15	20-300	13	20
8	65	30	4,0	80	45	10	20	36
29	70	25	3,5	105	10	10-60	20	67
40	50	42	5,0	105	40	16-100	17	42
42	70	-	2,0	55	50	10-200	12	20
43	60	53	6,0	80	55	10-40	13	27
44	65	20	2,5	100	30	20-160	15	43
45	55	40	3,5	120	60	6-120	41	100
46	50	40	2,0	70	40	20-150	7	8

obtenida en una de las células. En A, se muestran los cambios de potencial producidos por la inyección de pulsos de corriente de 65 ms de duración y de distinta polaridad y amplitud; con pulsos negativos la respuesta de la membrana fue puramente pasiva, el curso temporal del cambio de potencial se debe exclusivamente al componente capacitativo y resistivo de la membrana; con pulsos positivos, la respuesta fue también pasiva hasta un cierto valor de despolarización a partir del cual se produjeron potenciales de acción.

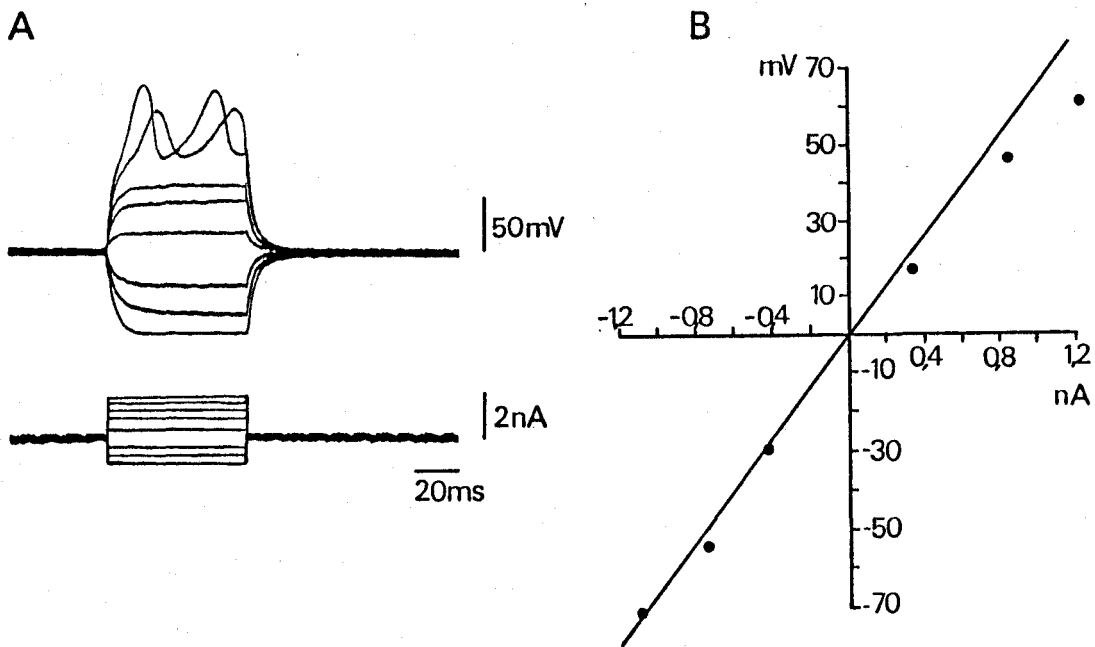


Figura 25. A. Registro de la respuesta de una célula adrenocortical en la solución control (2,7 K<sup>+</sup>, 4 Ca<sup>2+</sup> en tabla I) ante la inyección de pulsos de corriente de distinta amplitud y polaridad. Potencial de membrana, -70 mV. B. Relación I/V subumbral de la misma célula obtenida a partir de los datos representados en A.

La relación I/V en esta misma célula para valores por debajo del umbral se representa en la parte B de la figura. Para cada amplitud de corriente se ha tomado el valor de potencial alcanzado al final del pulso. Como se observa en la figura, la relación I/V obtenida no es totalmente lineal. Para una misma cantidad de corriente el cambio de potencial es menor en el sentido de la despolarización que en el de la hiperpolarización; esta pequeña rectificación observada a potenciales positivos, puede deberse a la activación de una conductancia al  $K^+$  de menor umbral que el de los canales que dan lugar a los potenciales de acción (véase 1.2).

### 1.2. Potenciales de acción.

En todas las células registradas la inyección de pulsos de corriente despolarizante dió lugar a la producción de potenciales de acción. En ausencia de estimulación eléctrica no se observaron potenciales de acción de forma espontánea. Las características principales de los potenciales de acción en las células Y-1 se resumen en la Tabla IV.

En la mayoría de los casos la despolarización a nivel umbral dió lugar a la generación de un único potencial de acción mientras que, despolarizaciones mayores produjeron generalmente potenciales de acción de forma repetitiva. El umbral de disparo varió de una célula a otra pero fue generalmente muy alto ( $42,9 \pm 17$  mV,  $n=12$ );

la amplitud de la espiga, que en la mayor parte de los casos sobrepasó el nivel cero, osciló entre 55-140 mV ( $90 \pm 24,5$  mV  $n=12$ ).

Los potenciales de acción se caracterizaron por tener una fase de subida lenta ( $18 \pm 9$  V/s,  $n=11$ ), una meseta de duración variable y una fase de repolarización más rápida ( $41 \pm 26$  V/s,  $n=11$ ). En los registros se observó así mismo, una fase de despolarización lenta antes de la generación de la espiga (similar al potencial marcapaso descrito en algunos tipos de células) y una posthiperpolarización de amplitud y duración variables.

La duración de los potenciales de acción en una misma célula fue muy variable principalmente debido a un progresivo ensanchamiento de la fase de meseta ante pequeños incrementos en la amplitud del estímulo, e incluso con estímulos de intensidad constante. La duración mínima fue  $13,4 \pm 5$  ms ( $n=11$ ) y la máxima de 30-300 ms. Esta variación en la duración de los potenciales de acción es una de las características más llamativas de estas células (su posible papel funcional se tratará en "Discusión").

Las Figuras 26 y 27 muestran potenciales de acción registrados en la solución estándar ( $4$  mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) en dos células adrenocorticales representativas. En la parte A de la figura 26 se observa que la despolarización producida por la inyección de un pulso de corriente de 2 nA y 100 ms

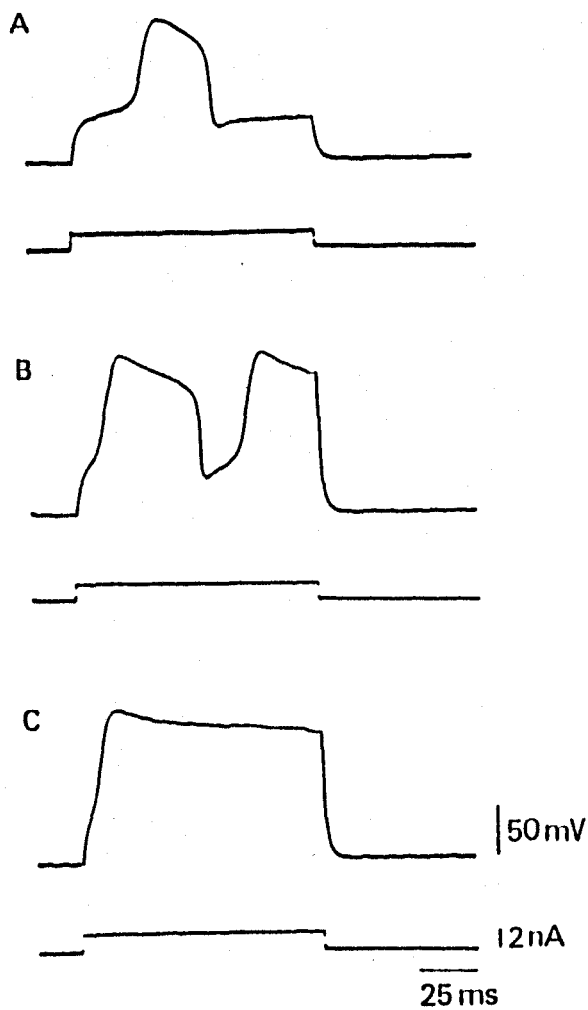


Figura 26. Registro intracelular de potenciales de acción en la solución control. A. Potencial de acción único provocado por la inyección de un pulso de corriente positiva. B y C. Potenciales de acción de duración creciente ante pequeños incrementos en la cantidad de corriente inyectada. Potencial de membrana,  $-50$  mV.

de duración da lugar a la generación de un potencial de acción único. Tras la respuesta pasiva de la membrana se observa una fase de despolarización lenta de unos 20 ms de



duración que se continúa con la fase de subida del potencial de acción. El umbral de disparo en esta célula fue de 40 mV. Como puede observarse en este registro, la larga duración del potencial de acción viene determinada sobre todo por una fase de meseta que prolonga la despolarización; durante esta fase, el potencial de membrana disminuye lentamente hasta cierto valor, a partir del cual, se produce una repolarización más rápida seguida de una pequeña posthiperpolarización. La amplitud pico a pico del potencial de acción en este caso fue de 105 mV. En las partes B y C de la misma figura se observan potenciales de acción de características similares pero de mayor duración. Esta variación se debió a pequeños incrementos en la cantidad de corriente inyectada; en el registro en B la duración de los potenciales de acción aumentó 12 ms con respecto al registro en A y en C duró tanto como el pulso de corriente. El incremento en la duración de los potenciales de acción se observó en la totalidad de los registros realizados y no se debió a una alteración de las conductancias repolarizantes, ya que este fenómeno fue en la mayoría de los casos totalmente reversible.

En la Figura 27 se muestran los potenciales de acción registrados en una célula con un potencial de membrana de -85 mV. Las características de estos potenciales son similares a las descritas en la figura anterior. Se observa una fase de despolarización lenta, previa a la

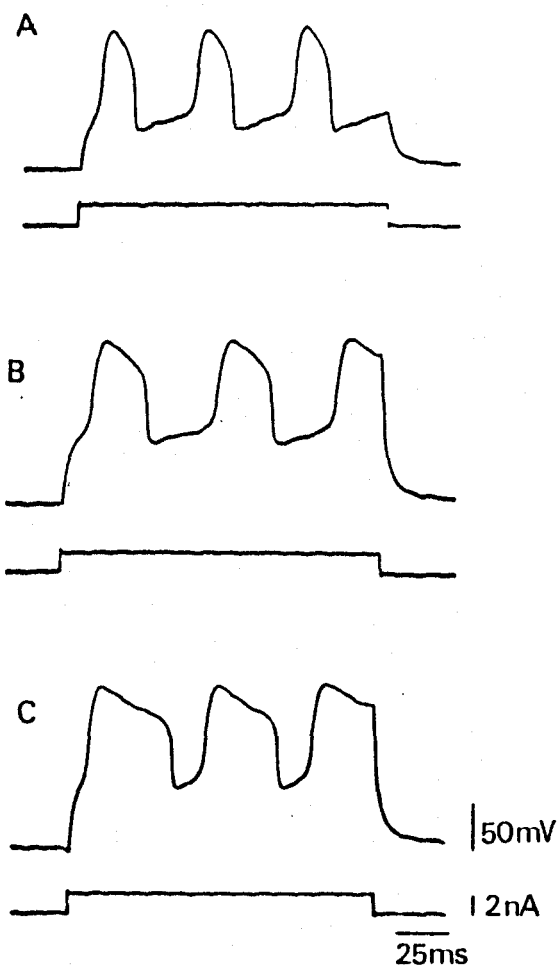


Figura 27. A, B y C. Potenciales de acción registrados en la solución control. La duración de los mismos aumenta con pequeños incrementos en la amplitud de los pulsos de despolarización. Potencial de membrana  $-85$  mV.

generación de la espiga, y una meseta de duración variable. Tras la repolarización aparece una pequeña posthiperpolarización. En este caso, el umbral de disparo fue de  $65$  mV, la amplitud máxima de los potenciales de

acción fue de 120 mV y la duración de los mismos varió dependiendo de la cantidad de corriente inyectada. Como en el ejemplo anterior, pequeñas variaciones en la amplitud del pulso de corriente dieron lugar a incrementos progresivos de la duración de los potenciales de acción. En los ejemplos que se muestran en la figura la duración de los potenciales varió entre 15 (A) a 37 (C) ms.

La variación de la duración de los potenciales de acción en una misma célula no solo se observó con incrementos de la cantidad de corriente inyectada, sino que en algunos casos se puso de manifiesto durante el disparo repetitivo de potenciales durante un pulso de corriente de amplitud constante. En la Figura 28 se muestra un ejemplo de este tipo de registros. En este caso (parte A de la figura) la inyección de una pequeña cantidad de corriente, 0,3 nA, durante un pulso de 300 ms dió lugar a la producción de potenciales de acción de duración creciente; la amplitud de los mismos así como la de la poshiperpolarización fue en este caso también progresiva. En la parte B de la figura se muestran los mismos potenciales de acción superpuestos y a una velocidad de barrido más rápida evidenciándose los cambios de duración y amplitud. Un análisis cuantitativo de los cambios referidos anteriormente se ilustra en la Figura 29. Los valores se han expresado en tantos por ciento y en relación con los que presenta la última espiga. En A se representa la variación en la amplitud de las espigas,

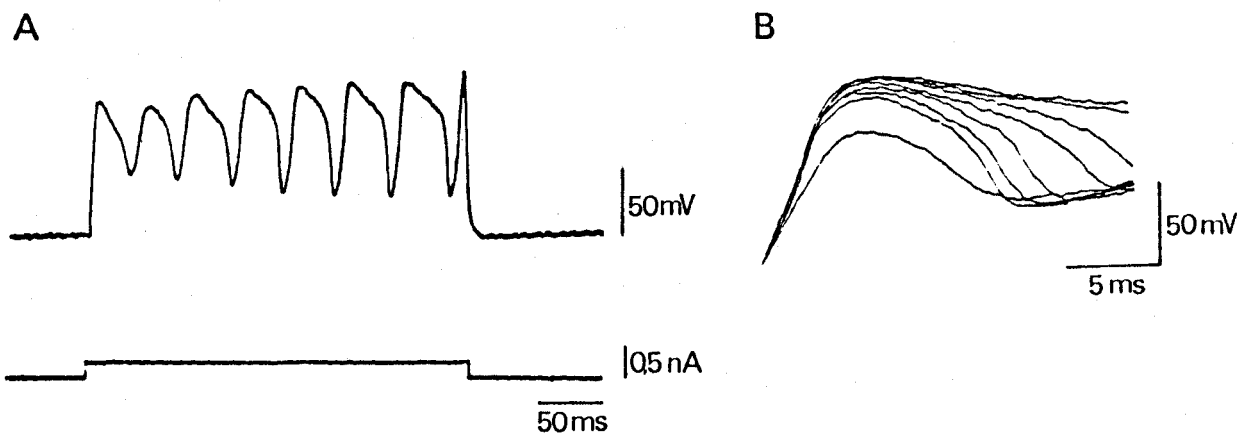


Figura 28. A. Potenciales de acción registrados en la solución control cuyas amplitudes, duraciones y valor de la posthiperpolarización aumenta progresivamente durante la inyección de un pulso de corriente positiva de amplitud constante. Potencial de membrana,  $-65$  mV. B. Potenciales de acción superpuestos del registro en A reproducidos a una velocidad de barrido más rápida.

en B la duración de las mismas, en C la amplitud de la posthiperpolarización y en D el área total de cada espiga. En todos los casos se observa un incremento progresivo de estos parámetros: la amplitud de los potenciales de acción varía hasta un 20 %, la duración de los mismos y la posthiperpolarización más de un 40 % y el área de la espiga más del 60 %.

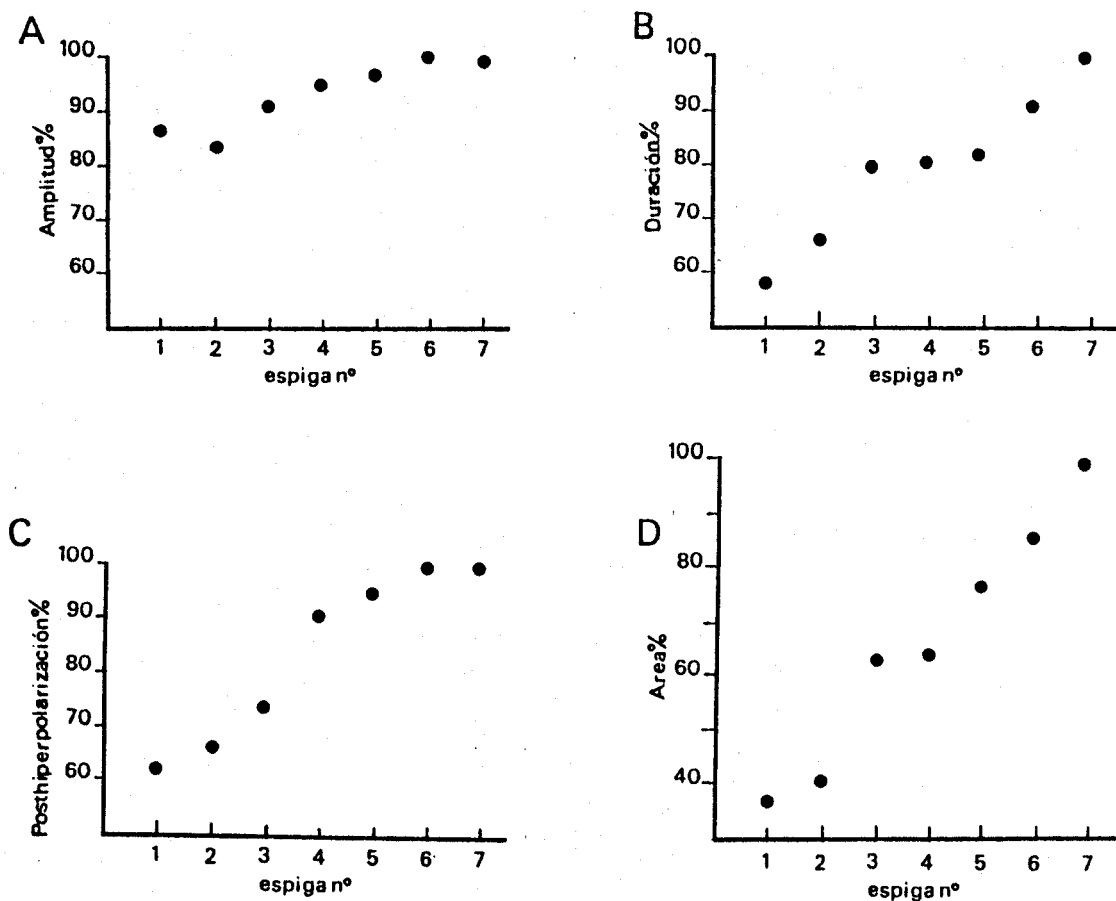


Figura 29. Valores de la amplitud (A), duración (B), posthiperpolarización (C) y área (D) de los potenciales de acción del registro de la figura 28. Los valores se expresan en % en relación a los de la última espiga.

### 1.3. Conductancias iónicas

Para la caracterización de las conductancias iónicas responsables de la generación de los potenciales de acción en células Y-1 se realizaron experimentos donde se sustituyeron iones permeables del líquido extracelular por otros menos permeables y/o se añadieron bloqueantes específicos de las conductancias iónicas de la membrana.

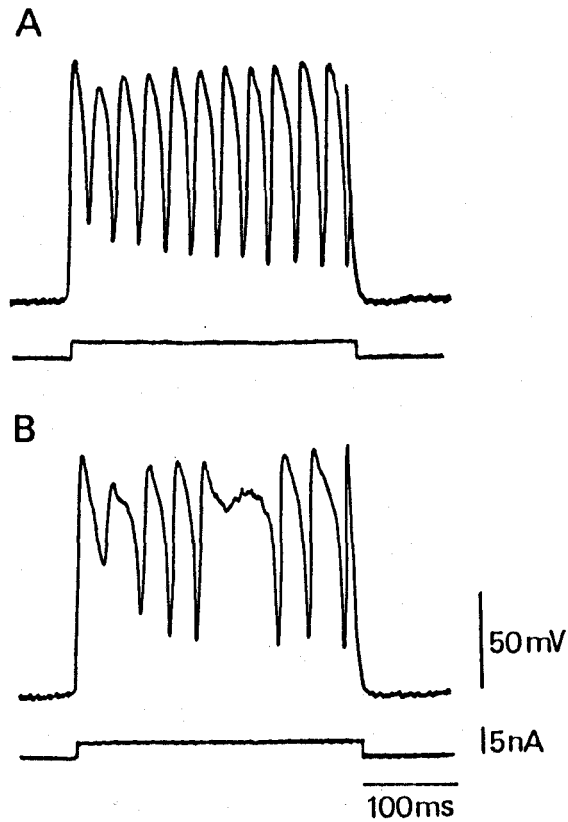


Figura 30. Potenciales de acción registrados en presencia de 1  $\mu\text{M/ml}$  de TTX en la solución externa. En B se aplicó un pulso de corriente positiva de amplitud ligeramente mayor que en A. Potencial de membrana  $-70$  mV.

La adición de TTX a la solución externa o la sustitución de los iones de  $\text{Na}^+$  de la solución control por  $\text{Tris}^+$ , no afectó a la producción de potenciales de acción ni a las características de éstos. En la Figura 30 se muestran potenciales de acción registrados tras añadir TTX (1  $\mu\text{M/ml}$ ) a la solución estándar. Como se observa en la misma (A), la despolarización de la membrana mediante un pulso de 2,8 nA y 300 ms produjo el disparo repetitivo de potenciales de acción de características similares a los registrados en la

solución control (compárese, por ejemplo, con el registro de la figura 2B). Un pequeño incremento en la corriente inyectada (B) dió lugar, como los ejemplos presentados anteriormente, a un incremento en la duración de los potenciales de acción.

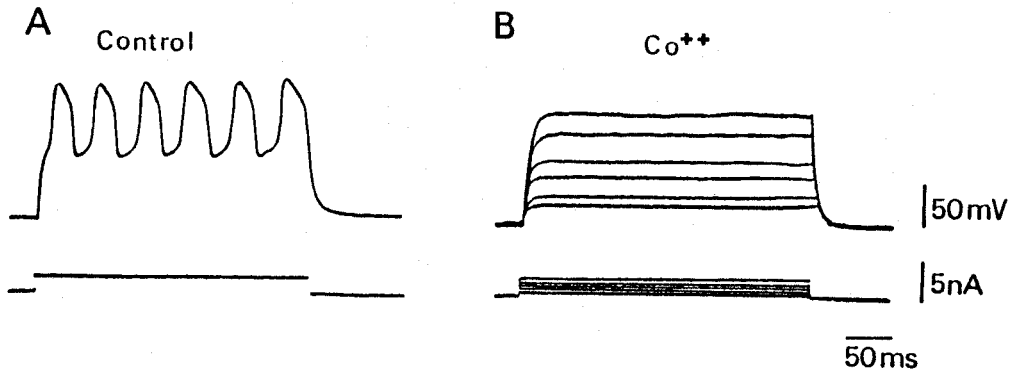


Figura 31. A. Potenciales de acción registrados en la solución control. B. Registro en la misma célula tras la sustitución de 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  por 2,4 mM  $\text{Co}^{2+}$ . Potencial de membrana -70 mV.

La sustitución de la solución control por otra conteniendo cobalto (solución 2,4  $\text{Co}^{2+}$ , 2  $\text{Ca}^{2+}$  en la tabla I) bloqueó por completo la producción de potenciales de acción. Un ejemplo de este efecto se muestra en la Figura 31. El registro en A corresponde al realizado en la solución control y en él se observa la respuesta típica de la membrana ante la inyección de un pulso de corriente positiva. La sustitución de esta solución por otra con cobalto (B) dió lugar a la total desaparición de los potenciales de acción.

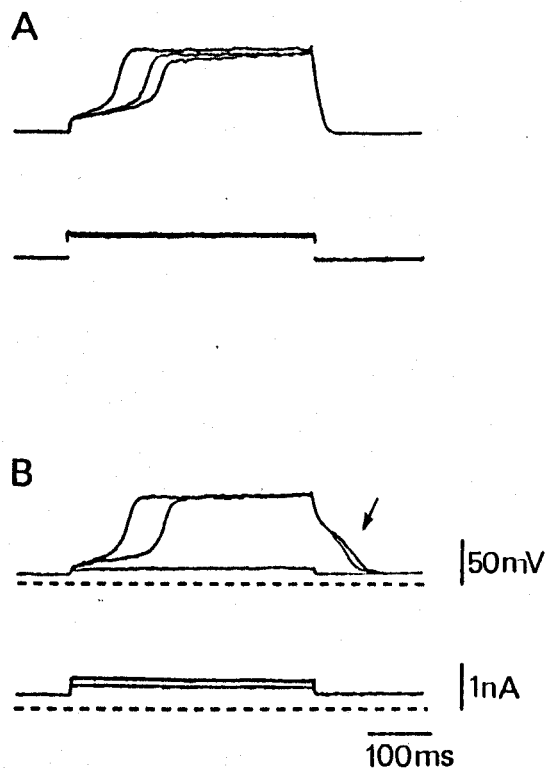


Figura 32. A y B. Potenciales de acción de bario. En B se inyectó corriente continua positiva que dió lugar a la respuesta señalada mediante una flecha (véase texto).

Los potenciales de acción aumentan en duración y presentan un umbral más bajo cuando se sustituye el calcio externo por bario. Las características de los potenciales de acción de  $Ba^{2+}$  se pueden observar en la Figura 32. En A la inyección de un pulso de 0,4 nA dió lugar a una despolarización muy lenta del potencial de membrana de unos 22 mV de amplitud, tras la cual se produjo un



potencial de acción de bario de 68 mV y de más de 250 ms de duración. Pequeños aumentos en la amplitud del pulso de estimulación produjeron potenciales de acción similares pero que alcanzaron el umbral antes por ser la fase de despolarización inicial más rápida (las duraciones de éstas fueron 130, 100 y 60 ms respectivamente para los 3 pulsos de corriente de la figura).

En la parte B de la misma figura se muestran otros 3 registros superpuestos de la misma célula y con igual solución en la cámara de registro pero en los que se inyectó de forma continua 0,3 nA de corriente positiva. Como se observa en la misma, la amplitud del primer pulso fue insuficiente para producir la respuesta activa de la membrana pero no así la de los dos restantes. Las características de los potenciales de acción en esta situación fueron similares a las observadas en los registros en A; no obstante, en los registros en B la repolarización de la membrana al final del pulso de corriente fue más lenta, observándose además durante la misma una nueva despolarización (señalada en la figura con una flecha). La interpretación de este fenómeno es difícil aunque se podría explicar asumiendo la existencia de dos tipos de canales de calcio en células Y-1, similares a los descritos en otras células (Hagiwara y col., 1975; Llinás y Yaron, 1981; Armstrong y Matteson, 1985). La mayor lentitud en la repolarización debida a la inyección de un nivel constante de corriente positiva,

permitiría la activación de los canales de calcio de más bajo umbral, previamente inactivados, por los que entraría de nuevo bario produciendo la postdespolarización observada en B.

La hipótesis de dos poblaciones de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , una formada por canales de bajo umbral que se inactivan rápidamente, y otra por canales de mayor umbral y que se inactivan más lentamente que los anteriores, es también compatible con las dos fases observadas al comienzo del pulso de despolarización (lo que hemos denominado despolarización lenta y potencial de acción propiamente dicho).

Otra de las conductancias existentes en estas células es la que resulta de la activación de canales de  $\text{K}^{+}$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ , cuyas características se han analizado en detalle con la técnica de "patch clamp". En los registros intracelulares esta conductancia es posiblemente la responsable de la repolarización del potencial de acción y de la posthiperpolarización que se observa posteriormente. Su papel en la limitación en la duración del potencial de acción, y con ello, en la regulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula se tratará en "Discusión".

Las células adrenocorticales son, por tanto, eléctricamente excitables y, al igual que otras células secretoras, poseen un potencial de membrana bastante negativo. No obstante, las células adrenocorticales Y-1 son desde el punto de vista electrofisiológico poco

usuales ya que los potenciales de acción que generan, además de tener un alto umbral, parecen deberse exclusivamente a la activación de una conductancia de calcio y no de sodio y calcio como ocurre en la mayoría de las células endocrinas excitables.

## 2. Registro con la técnica de "patch clamp". Canal de potasio activado por calcio

Los experimentos realizados con la técnica de "patch clamp" se han centrado en la identificación y análisis de un canal de  $K^+$  de gran conductancia presente en la membrana de las células Y-1. La activación de este canal depende del potencial de membrana y de la concentración intracelular de calcio iónico ( $[Ca^{2+}]_i$ ) y en sus características es similar al canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  registrado en otros tipos de células (Marty, 1981; Barrett y col., 1982; Wong, 1982; Blazt y Magleby, 1984;). Este canal se encuentra homogéneamente distribuido en la membrana de las células Y-1 y por su gran conductancia (180 pS en soluciones simétricas de 130 mM  $K^+$ ; véase más adelante) se registra con facilidad.

Aunque como se muestra en el apartado 2.7, en células Y-1 se han registrado otros tipos de canales de  $K^+$ ; el presente estudio se ha centrado en el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  dado su gran interés desde el punto de vista funcional como regulador de la entrada de calcio durante el potencial de acción y, por tanto, su participación en la regulación de la secreción de hormonas esteroideas.

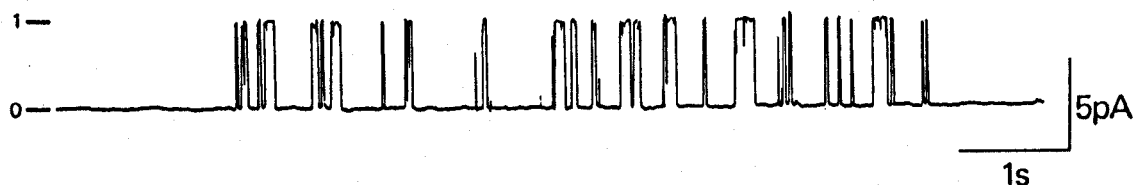


Figura 33. Registro "in situ" del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ . Las aperturas y cierres del canal aparecen como pulsos de corriente de amplitud constante y duración variable. Los números 0 y 1 a la izquierda del registro indican los niveles de corriente registrados.

### 2.1. Estudio del canal "in situ"

Los primeros experimentos realizados con esta técnica se hicieron en la configuración de "cell-attached" y con soluciones de composición similar a la fisiológica. En esta configuración se registró corriente hacia fuera, cargas positivas moviéndose del interior de la célula a la pipeta, en forma de pulsos de amplitud constante y duración variable. En la Figura 33 se muestra un registro en "cell-attached" en el que se observan pulsos de corriente de aproximadamente 5 pA de amplitud y de unos pocos milisegundos de duración; en el registro aparece un solo nivel de corriente lo que indica la existencia en este área de membrana de un solo canal. La corriente aparece en forma de pulsos debido a que el canal pasa sucesivamente del estado abierto al de cerrado y, por tanto, a conducir corriente o no. En la figura, algunos de los eventos aparecen de menor amplitud que el resto debido a que las aperturas más breves resultan filtradas a causa de la limitada respuesta de frecuencia del sistema de registro (véase apartado 3.3. de "Métodos").

$\Delta V_m$  (mV)

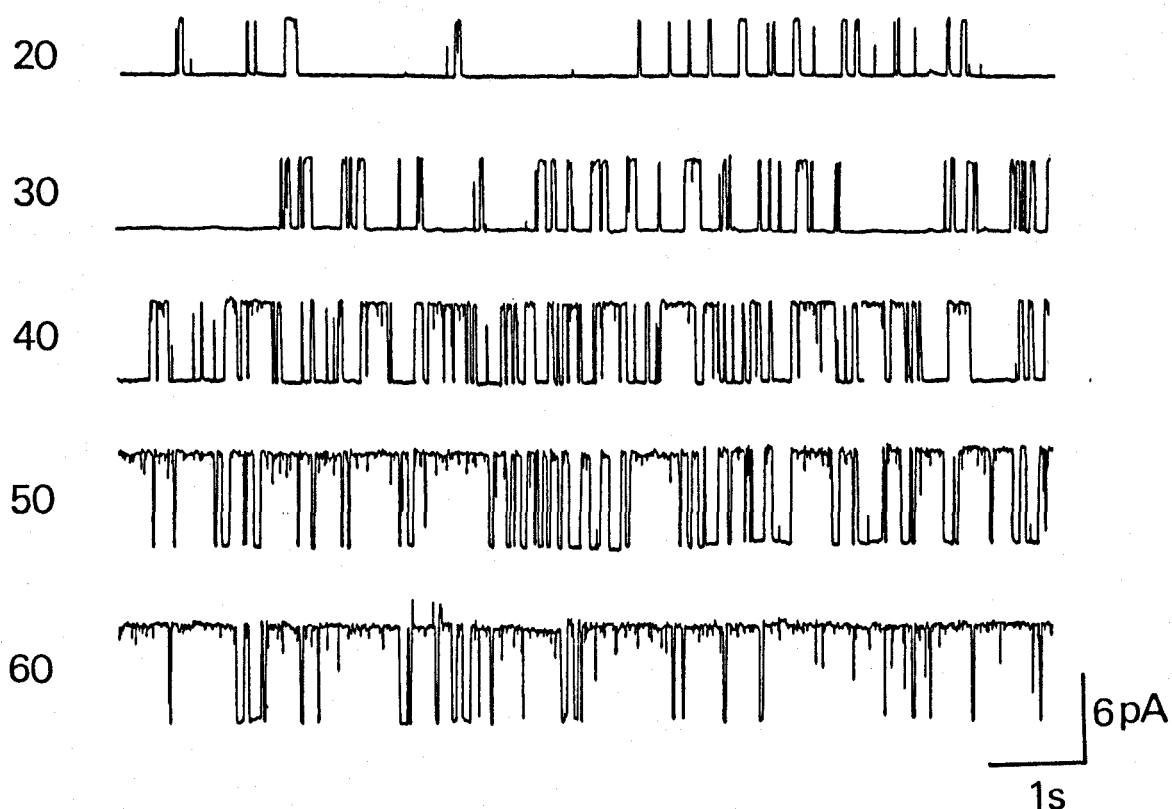


Figura 34. Registro "in situ" del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ . Las despolarizaciones sobre el potencial de membrana aparecen a la izquierda de cada registro. Solución en el baño y en la pipeta, 2,7  $K^+$ , 1  $Ca^{2+}$  en tabla II.

La variación del potencial en el área de membrana sellada por la pipeta modificó notablemente la actividad del canal "in situ". En la Figura 34 se muestra un registro a distintos potenciales de membrana en el que se observa un aumento de la amplitud de la corriente a través del canal a medida que se despolariza la membrana (aumenta el gradiente eléctrico para el  $K^+$ ) así como un incremento de la actividad del mismo. Como se ilustra en la figura, a 20 mV de despolarización

sobre el potencial de reposo, las aperturas del canal son poco frecuentes y de corta duración (generalmente menos de 100-150 ms) siendo a este potencial la probabilidad del canal de estar abierto ( $P(a)$ ) menor de 0,01. A 40 mV sobre el potencial de reposo, el canal se abre con mayor frecuencia y permanece más tiempo en este estado. A este potencial de membrana la mayoría de las aperturas duran entre 100-500 ms y el tiempo total que permanece abierto es casi del 60 %. Una despolarización aún mayor, de 60 mV sobre el potencial de membrana, da lugar a que el canal permanezca abierto la mayor parte del tiempo, pasando generalmente solo al estado cerrado durante espacios muy cortos. La  $P(a)$  a este potencial de 0,8-0,9.

La probabilidad del canal de estar abierto en función del potencial de membrana se muestra en las gráficas de la Figura 35. La curva que relaciona  $P(a)$  con el potencial de membrana tiene forma sigmoide (véase parte A de la figura) con una pendiente muy pronunciada entre 25-45 mV de despolarización. Al potencial de membrana, la  $P(a)$  es prácticamente cero, alcanza un valor medio con 30-40 mV de despolarización y es aproximadamente de 0,9 con despolarizaciones de 60-70 mV. En B se ha representado esta misma relación en forma semilogarítmica, observándose que con pequeñas despolarizaciones sobre el potencial de membrana (parte recta de la curva) la probabilidad que tiene el canal de estar abierto cambia e veces por cada 7-10 mV de despolarización.

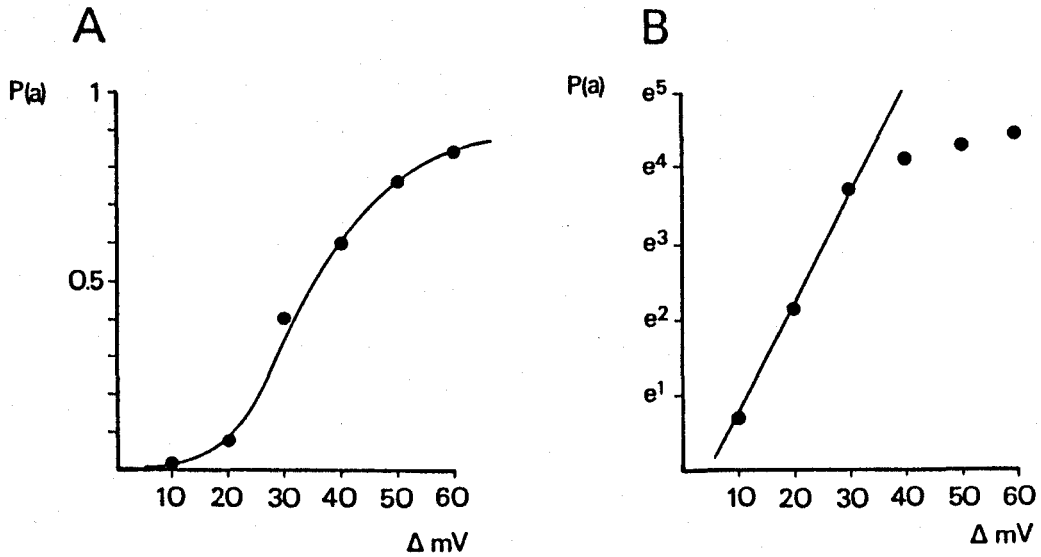


Figura 35. A. Representación gráfica de la probabilidad del canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> de estar en estado abierto (P(a)) en función del potencial de membrana en situación de "cell-attached" y con soluciones fisiológicas tanto en el baño como en la pipeta (solución igual que en la figura 34). B. Representación semilogarítmica de los datos en A.

## 2.2. Dependencia de la concentración de calcio intracelular

Para estudiar la activación del canal a distintas concentraciones de Ca<sub>i</sub><sup>2+</sup> se realizaron experimentos en membrana escindidas. En todos los casos se utilizaron soluciones simétricas de K<sup>+</sup> (130 mM) y el canal se registró a distintos potenciales de membrana para calcular la P(a) en un amplio rango de voltajes.

Estos experimentos demostraron que la probabilidad de este canal de K<sup>+</sup> de estar abierto depende, además del potencial de membrana, de la concentración de calcio en el lado interno de la membrana y que, por el contrario, el calcio extracelular (desde 1-50 μM) no afecta a las características electrofisiológicas y cinéticas del canal.

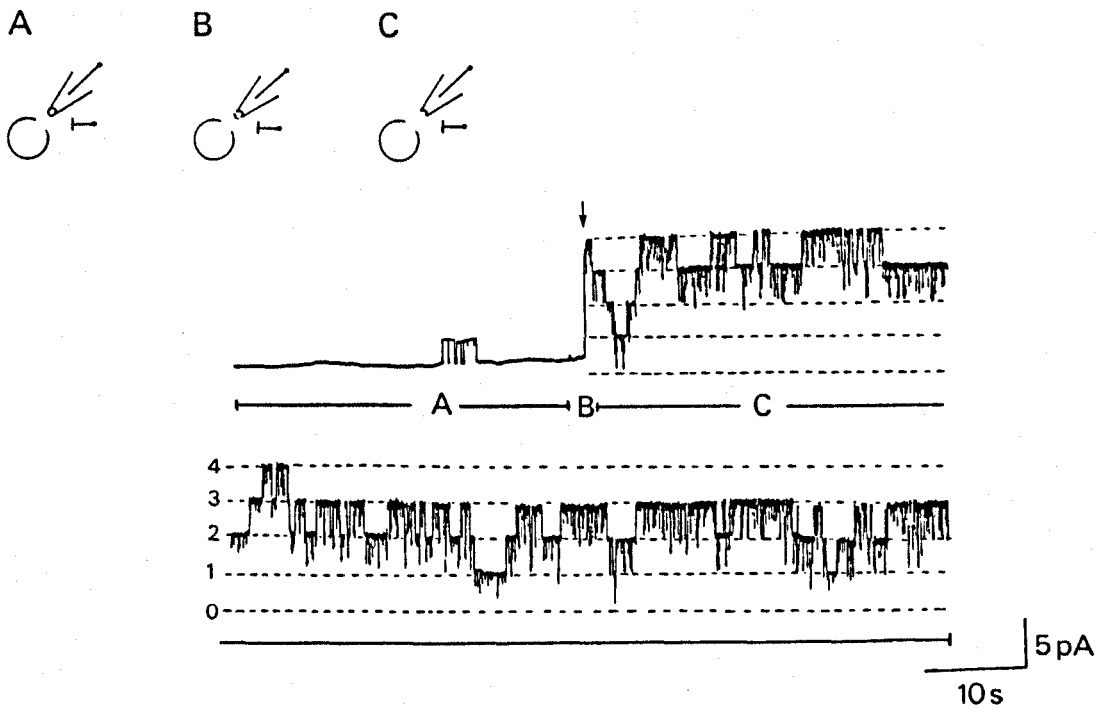


Figura 36. Registro obtenido tras la escisión de un parche de membrana. A. Actividad registrada después de retirar el electrodo de la célula (vesícula). B. Cambio brusco del nivel de corriente (ruptura de la vesícula). C. Aumento del número de canales activos al entrar en contacto la solución del baño con la cara interna de la membrana escindida ("inside-out"). Soluciones, 5 K<sup>+</sup>, 1 Ca<sup>2+</sup>//130 K<sup>+</sup>, 1 Ca<sup>2+</sup>.

Un ejemplo del proceso de obtención de parches escindidos se muestra en la Figura 36. Al retirar la pipeta de la célula después de obtener un gigasello, se forma frecuentemente en la punta de la micropipeta una vesícula conteniendo líquido intracelular. La actividad de los canales incluidos en el microárea de membrana sellada en esta situación suele ser muy pequeña o nula (parte A de la figura). La ruptura espontánea de la vesícula o provocada por la exposición de la micropipeta al aire durante 1-2 s (B) da lugar en la mayoría de los casos a un aumento de la actividad registrada (C) cuando la [Ca<sup>2+</sup>] en la solución en contacto con la cara interna es superior a la de la vesícula (en el ejemplo de la figura en el baño había 1 mM Ca<sup>2+</sup>).



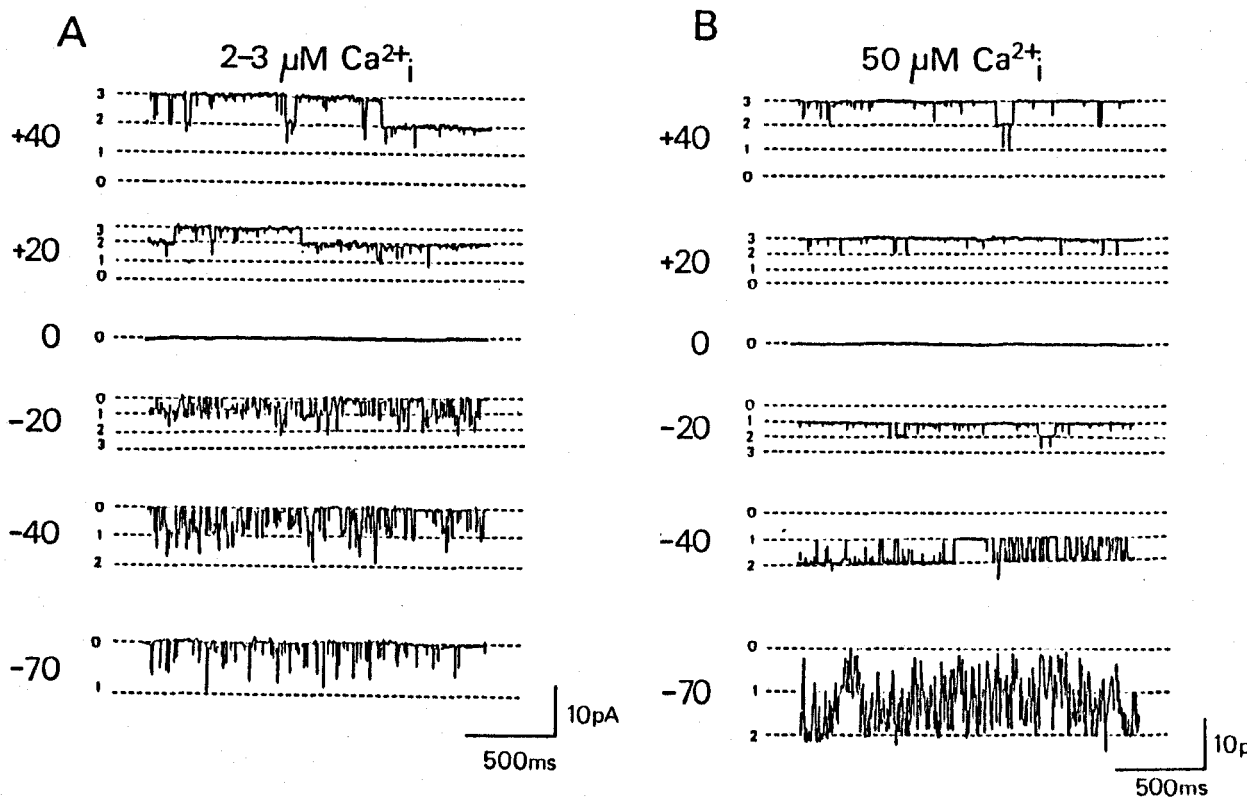


Figura 37. Registros de corriente en dos microáreas de membranas escindidas a distintos potenciales de membrana. En ambos registros se observan 4 niveles de corriente representados por 0, 1, 2 y 3 que representan los 3 canales activos en cada microárea. Los experimentos se realizaron con soluciones simétricas de 130 mM K<sup>+</sup> y a las concentraciones de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, especificadas en la parte superior de la figura.

Dos ejemplos de la actividad de estos canales a distintas [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se muestran en la Figura 37. En ambos, las condiciones experimentales fueron similares con excepción de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, que en A fue de 2-3 μM y en B de 50 μM. La actividad de los canales se registró en un rango de 130 mV (desde -70 a +40). En los registros realizados con 2-3 μM Ca<sup>2+</sup> se observa que los 3 canales existentes en este microárea de membrana permanecen la mayor parte del tiempo

abiertos a voltajes mayores de 0 mV pero, a medida que se hiperpolariza la membrana la  $P(a)$  disminuye progresivamente (a -20 mV se abre un canal y excepcionalmente dos y a -70 mV solo se abre uno y durante tiempos muy cortos). En los registros del experimento con 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  se observa así mismo que a voltajes positivos los 3 canales existentes en este microárea de membrana están abiertos la mayor parte del tiempo y que la  $P(a)$  disminuye progresivamente con voltajes negativos. No obstante, si se compara la dependencia de voltaje en A y B se observan claras diferencias entre ambos, sobre todo a los potenciales más negativos (compárese por ejemplo la actividad a -70 mV).

Para descartar la posibilidad de que estas diferencias se deban en parte a distinto grado de sensibilidad al voltaje de los canales registrados en uno y otro caso, o a cualquier otra variable, se realizaron experimentos en los que en un mismo área de membrana se registró la actividad del canal a distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Un experimento de este tipo se muestra en la Figura 38. El registro se llevó a cabo en un primer momento en una solución sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido (aprox. 2-3  $\mu\text{M}$ ) y con posterioridad, mediante la adición de EGTA, a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0,01  $\mu\text{M}$ . En la solución sin EGTA, a +40 mV los tres canales existentes en este área de membrana permanecen la mayor parte del tiempo abiertos, la corriente fluctúa entre el nivel 2 y 3 y,

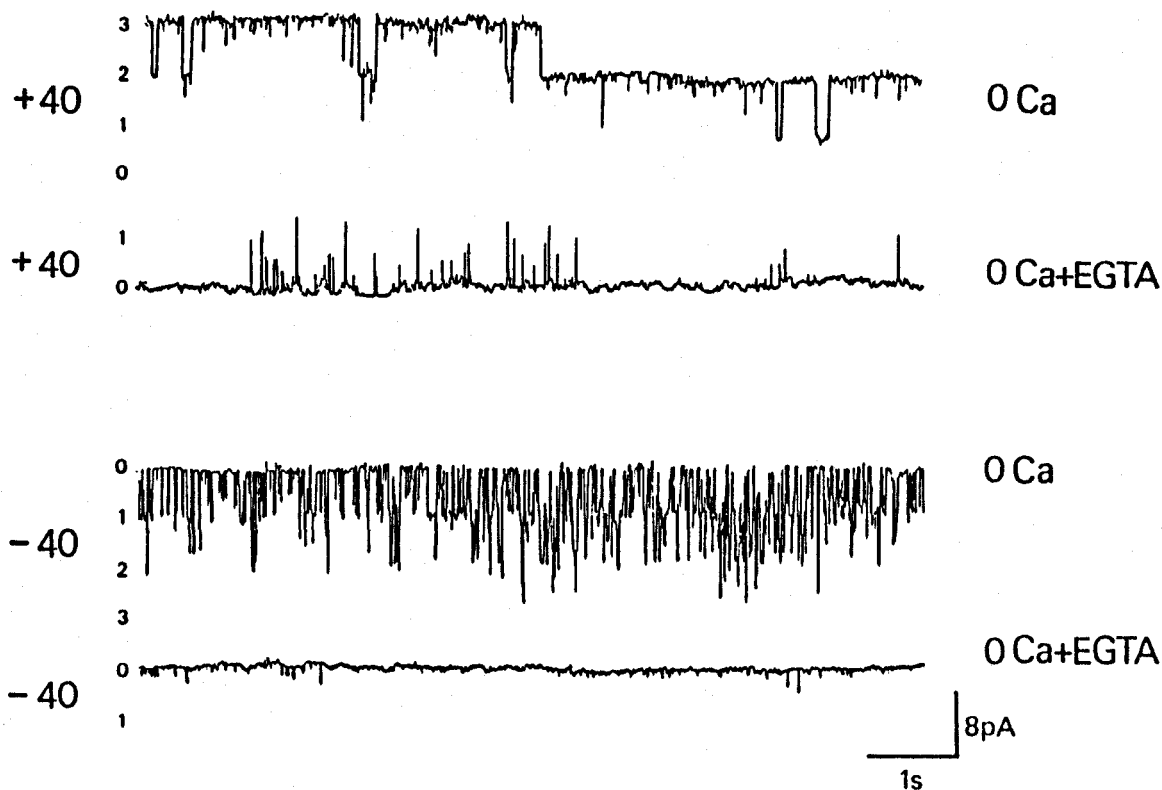


Figura 38. Registro de la actividad de 3 canales en un mismo microárea de membrana a diferentes voltajes y a distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , (soluciones simétricas de 130 mM  $\text{K}^+$ , configuración de "inside-out").

ocasionalmente, pasa al nivel 1; a -40 mV, la probabilidad de los canales de estar en el estado abierto es menor (la corriente fluctúa la mayor parte del tiempo del nivel 0 al 1 y, ocasionalmente, pasa a los niveles 2 y 3). En la solución con EGTA, se observa una disminución importante tanto del número de aperturas como del tiempo que los canales permanecen abiertos; en esta solución, a +40 mV se abre un solo canal a un tiempo y durante periodos de tiempo muy cortos, mientras que a -40 mV los 3 canales permanecen cerrados.

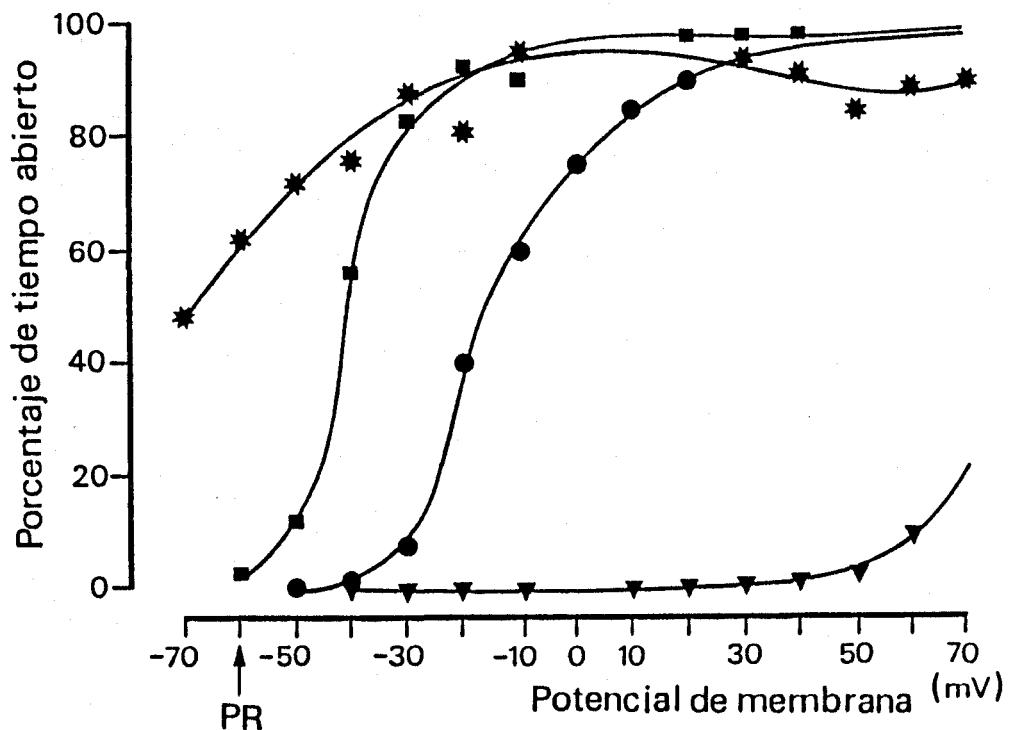


Figura 39. Representación gráfica de la actividad del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  (expresado como porcentaje de tiempo total que el canal permanece abierto durante un periodo de tiempo) en función del potencial de membrana y a distintas concentraciones de  $Ca^{2+}$ . Los círculos se han obtenido de un experimento realizado "in situ" y el resto de los símbolos de parches de membrana escindidos a distintas concentraciones de  $Ca^{2+}$ , (triángulos:  $0,01 \mu M$ , cuadrados:  $2-3 \mu M$ , estrellas:  $50 \mu M$ ).

El efecto del potencial de membrana y de la concentración de  $Ca_i^{2+}$  sobre la activación de estos canales se muestra en la Figura 39. Los valores obtenidos en registros en la célula intacta y que, por lo tanto, representan la activación del canal a la concentración fisiológica de  $Ca_i^{2+}$  (círculos) se han situado en la gráfica tomando como referencia un potencial de membrana de  $-60 \text{ mV}$ ; la forma de la curva que une los puntos muestra que a esta  $[Ca^{2+}]_i$ , la activación del canal es muy dependiente del potencial de membrana.

El resto de las curvas que se muestran en la gráfica se han obtenido de experimentos realizados en parches de membrana escindidos a distintas concentraciones de  $Ca_i^{2+}$ . En todos los casos el tiempo que el canal permanece abierto depende del potencial de membrana aunque la sensibilidad al voltaje varía en las diferentes condiciones experimentales. Mientras que a concentraciones extremas de  $Ca_i^{2+}$  la activación de los canales es poco dependiente del voltaje, a concentraciones próximas a la fisiológica la dependencia es mucho mayor. Con  $50 \mu M$   $Ca_i^{2+}$  (estrellas) los canales permanecen generalmente abiertos para un amplio rango de voltajes, incluso a potenciales de membrana muy negativos; por el contrario con  $0,01 \mu M$  (triángulos) los canales permanecen la mayor parte del tiempo cerrados, incluso a voltajes muy positivos.

### 2.3. Conductancia

La corriente iónica que atraviesa un canal está en función de la conductancia de dicho canal y del gradiente electroquímico para el ión permeable según la siguiente ecuación:

$$i_K = g_K (V - E_K) \quad (6)$$

donde  $i_K$  es la corriente de potasio a través de un canal,  $g_K$  la conductancia del mismo,  $V$  el potencial de membrana y  $E_K$  el potencial de equilibrio para el potasio.

De la ecuación (6) se obtiene el valor de la conductancia a cada voltaje, de forma que:

$$g_K = \frac{i_K}{(V-E_K)} \quad (7)$$

Si la conductancia del canal es lineal se puede estimar ésta mediante el cálculo de la pendiente de la recta que resulta de la representación gráfica de la relación I/V.

$$i_K = \frac{i_n - i_o}{(V_n - E_K) - (V_o - E_K)} \quad (8)$$

donde  $i_o$  y  $i_n$  son valores extremos de amplitud de corriente en la parte lineal de la curva y  $V_o$  y  $V_n$  son los voltajes a los cuales se producen dichas corrientes.

En la Figura 40 se muestran dos ejemplos de las curvas I/V obtenidas con 130 mM  $K^+$  a ambos lados de la membrana. En estas soluciones la conductancia del canal es lineal desde +50 a -50 mV pero disminuye generalmente con despolarizaciones e hiperpolarizaciones mayores. El canal presenta un valor medio de conductancia de  $181,5 \pm 52,9$  pS ( $n=29$ ), a 20-25 °C, siendo 110 el valor mínimo calculado y 314 el máximo.

El valor de la conductancia en soluciones simétricas no se vió afectado por variaciones en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  como puede apreciarse en la figura 38, las estrellas corresponden a experimentos realizados en 50  $\mu M$   $Ca_i^{2+}$  y los cuadrados en 2-3  $\mu M$ .

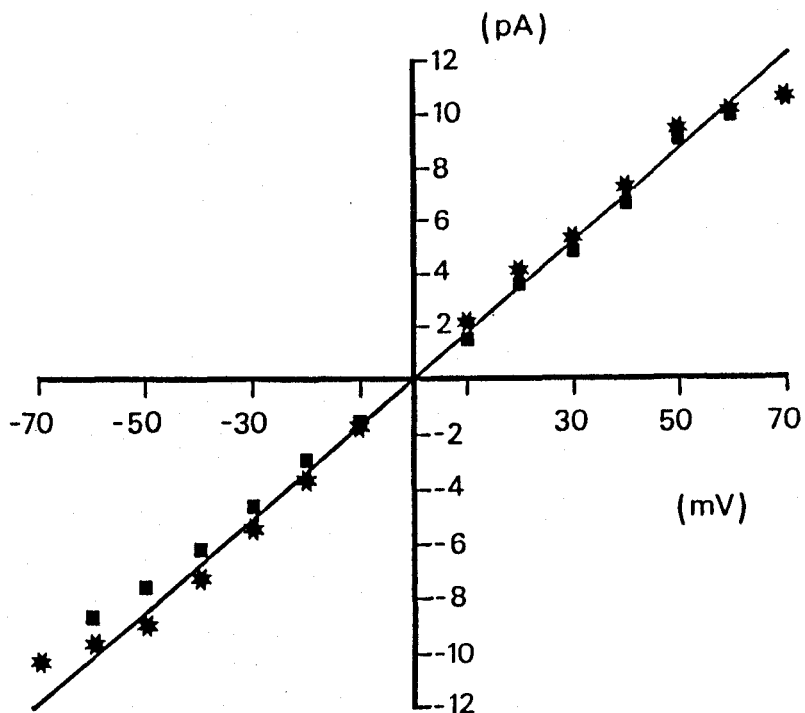


Figura 40. Representación gráfica de la amplitud de la corriente a través del canal en función del potencial de membrana. Los símbolos proceden de observaciones experimentales en microáreas de membranas escindidas con soluciones simétricas de 130 mM K<sup>+</sup>. La conductancia es lineal generalmente desde ±50 mV pero disminuye con valores más extremos. No se observan variaciones en el valor de la conductancia con concentraciones de Ca<sup>2+</sup>, distintas (estrellas: 50 μM, cuadrados: 2-3 μM).

## 2.4. Características cinéticas

### Estados intermedios de conductancia

El canal de K<sup>+</sup> activado por Ca<sup>2+</sup> presenta estados intermedios de conductancia; estos estados se caracterizan porque la corriente que resulta del paso de iones a través del canal es de menor amplitud que la unitaria. Se han identificado en este canal al menos dos subestados de conductancia que difieren principalmente por la cantidad de corriente que conducen, uno entre el 25-35 % de la total y otro el 55 % aproximadamente. Ambos estados intermedios se registraron a distintos potenciales de membrana y tanto en células intactas como en membranas escindidas.

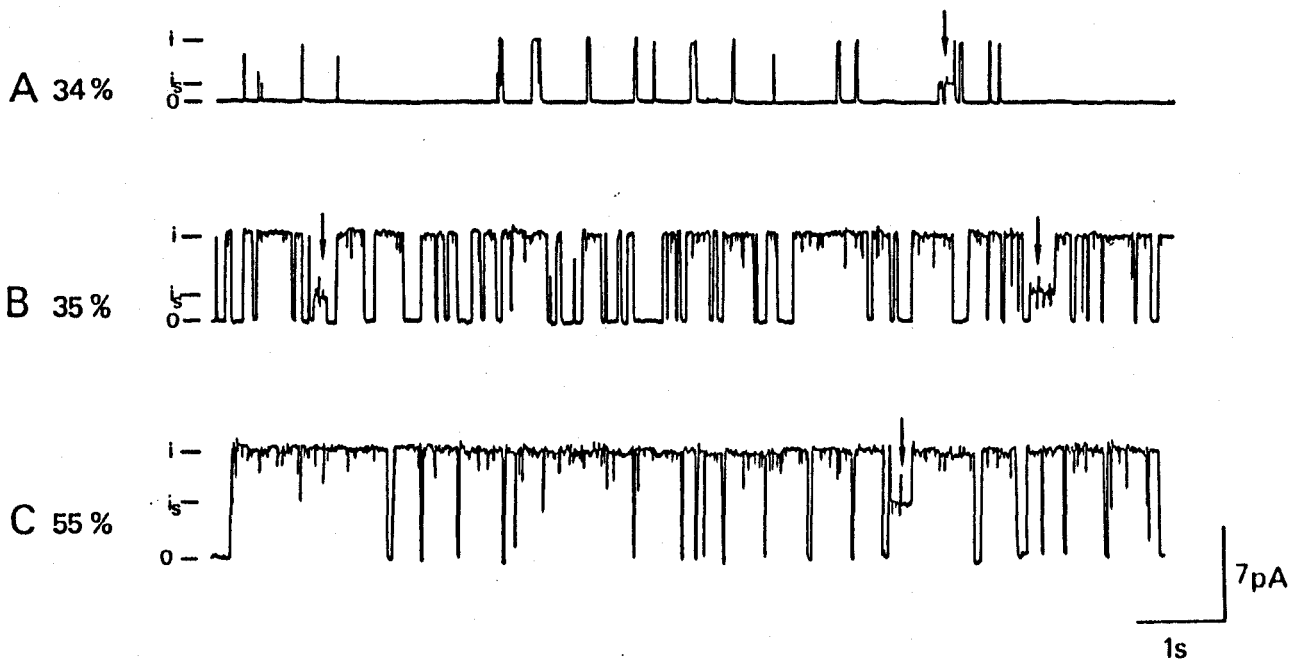


Figura 41. Estados intermedios de conductancia del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  (se señalan mediante flechas). El registro corresponde a un experimento "in situ" a 20 (A), 40 (B) y 60 mV (C) sobre el potencial de membrana. A la izquierda de cada registro se representa el nivel de corriente a través del canal en su estado normal ( $i$ ), y durante el subestado ( $i_s$ ). Las amplitudes relativas de  $i_s$  con respecto a  $i$  se muestran así mismo a la izquierda de cada registro. Soluciones en el baño y la pipeta  $2,7 K^+$ ,  $1 Ca^{2+}$ .

En la Figura 41 se pueden observar ambos subestados de conductancia. El registro corresponde a un experimento realizado "in situ" a distintos potenciales de membrana y en el que existía un solo canal. En A, a un potencial de membrana 20 mV más positivo que el de reposo, se observan dos niveles de corriente, uno de amplitud normal y otro del 34 % de la anterior. La aparición de este segundo nivel de corriente no se debió a la apertura de un segundo canal de distinta conductancia ya que durante todo el tiempo que duró el registro (aprox. 20 min.) nunca aparecieron ambos niveles superpuestos. En el fragmento de



registro representado en A el canal pasó al subestado desde el estado cerrado y desde éste pasó al estado normal abierto.

En el trazo B de la figura, donde el parche de membrana se despolarizó 40 mV, se observa dos veces un estado intermedio que conduce aproximadamente el 35 % de la corriente total; el canal entró en éste desde el estado cerrado y desde él, en un caso volvió a cerrarse y en otro al estado abierto normal. En el registro C aparece, por el contrario, un subestado distinto. En este caso se llevó el potencial de membrana a un voltaje (+60 mV) al cual la probabilidad del canal de estar abierto era muy alta. En esta situación, el canal entró en el subestado partiendo previamente de la situación de abierto y la corriente registrada fue el 55 % de la total. Tras este subestado pasó nuevamente al estado abierto normal.

En la Figura 42 se muestra otro de los registros donde se observaron ambos tipos de estados intermedios. En este caso en un microárea escindido con alto  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución en contacto con la cara interna de la membrana y a un potencial de membrana de 0 mV. Se observan cuatro niveles de corriente, dos correspondientes a los dos canales presentes en este área de membrana, y otros dos (señalados con las letras a y b), que corresponden a los dos subestados de conductancia; los fragmentos señalados con flechas, se muestra más abajo a una base de tiempo más

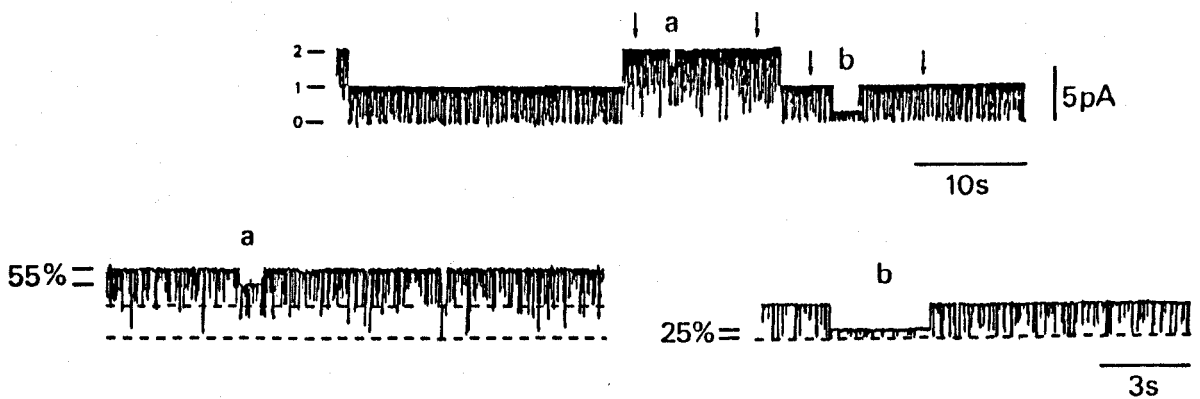


Figura 42. Estados intermedios de conductancia del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  registrados en un microárea de membrana escindida, a 0 mV. Los fragmentos del registro superior señalados con flechas se representan a mayor velocidad de barrido en la parte inferior de la figura. Los niveles 0, 1 y 2 indican los niveles normales de corriente a través de los dos canales existentes en este parche de membrana. A la izquierda de los registros inferiores se indican las amplitudes relativas de las corrientes a través de los subestados de conductancias. Soluciones 5  $K^+$ , 2  $Ca^{2+}$ ///130  $K^+$ , 2  $Ca^{2+}$ .

rápida. Como se observa a la izquierda de los registros, la cantidad de corriente que conducen estos subestados en relación con la amplitud total de la corriente es del 55 % en a, y 25 % en b. En el primer caso éste valor es idéntico al observado en los registros en "cell-attached" y, como en éstos, el canal entra en el mismo partiendo del estado abierto; en el segundo, es algo menor pero, como los registros A y B de la figura 41, aparece partiendo desde el estado cerrado.

Posiblemente, además de los estados intermedios de conductancia ya citados este canal posea otros subestados no identificados en este análisis, ya que si el tiempo que permanecen en ellos es menor de 5-6 ms no se han podido diferenciar de eventos rápidos de amplitud normal.

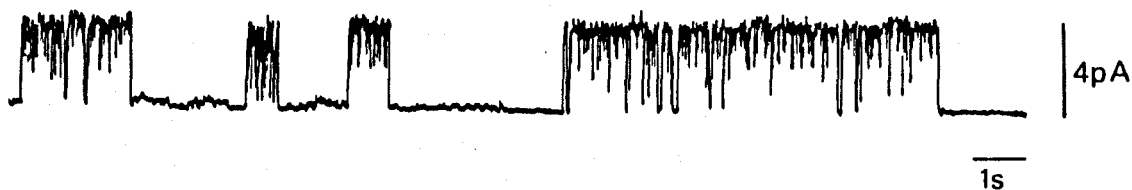


Figura 43. Distribución de las aperturas del canal en forma de brotes (véase texto). Registro realizado sobre un microárea de membrana escindido y a un potencial de membrana de +50 mV.

### Brotos

En determinadas condiciones las aperturas del canal aparecieron agrupadas en forma de brotes en vez de distribuirse de forma homogénea o al azar. Durante un brote el canal pasa sucesivamente de estado abierto a cerrado, permaneciendo en éste último durante espacios muy cortos de tiempo (del orden de  $\mu$ s). Entre brotes el canal permanece cerrado durante periodos largos de tiempo.

Dos ejemplos que ilustran este tipo de comportamiento cinético se muestran en las Figuras 43 y 44. En la primera, el registro se realizó en una membrana escindida y a un potencial de membrana de +50 mV; se utilizaron soluciones simétricas de  $K^+$  (130 mM) y la solución en contacto con la cara interna no contenía calcio (calcio iónico 2-3  $\mu$ M). Se observa un solo canal cuyas

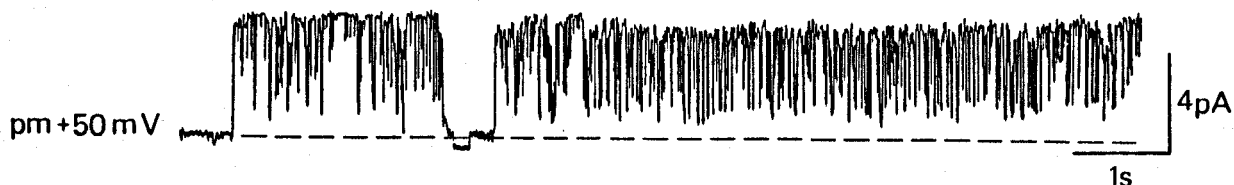


Figura 44. Aperturas distribuidas en forma de brotes en un registro realizado "in situ" y a 50 mV sobre el potencial de membrana. La mayoría de los cierres aparecen filtrados por el sistema de registro.

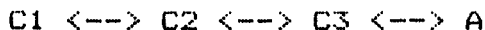
aperturas y cierres aparecen agrupadas a lo largo del registro. En relación con los periodos de tiempo que el canal permanece en el estado cerrado puede apreciarse, aún sin necesidad de realizar un análisis cuantitativo, que aunque la duración de los mismos es muy variable éstos pueden clasificarse al menos en 3 grupos bien definidos: cierres prolongados (pueden apreciarse 4 de más de 1 s), periodos medianamente largos (se observan 6 que duran entre 50 y 150 ms) y periodos cortos (son los más frecuentes y duran pocos milisegundos, algunos aparecen de menor amplitud por resultar filtrados por el sistema de registro). Otro ejemplo se muestra en la Figura 44 (las condiciones de registro se especifican en el pie de figura).

El que la duración de los tiempos que el canal permanece cerrado pueda agruparse al menos en tres rangos bien diferenciados, hace suponer que éste posee más de un estado cerrado y que, por tanto su cinética, no se ajusta

a un modelo simple del tipo:



sino a uno más complejo, como por ejemplo:



En nuestro estudio no se realizó un análisis cuantitativo a este nivel por la imposibilidad de mejorar la respuesta de frecuencia y, por tanto, de medir la duración de los cierres de más corta duración. En otras células, donde se ha llevado a cabo un análisis de este tipo en el mismo canal (Barrett y col., 1982; Magleby y Pallotta, 1983a,b), se han estudiado de forma detallada estos 3 estados cerrados así como los distintos estados abiertos en que también puede estar el canal (Magleby y Pallotta, 1983a). La probabilidad del canal de estar en un estado o en otro parece depender fundamentalmente de la  $[Ca^{2+}]_i$ , y más concretamente, del número de iones de Ca que se unen al canal (Magleby y Pallotta, 1983b).

#### Periodos silentes prolongados

Mientras que las aperturas y cierres de los canales a lo largo de un registro se distribuyó generalmente de forma homogénea o en brotes, en algunos experimentos se observaron periodos silentes de larga duración.

Un ejemplo se muestra en la Figura 45. Los registros proceden de a un experimento realizado "in situ" en los que se registró la actividad de un canal a distintos potenciales de membrana; la composición de las soluciones se especifican en el pie de figura. Como se observa en la

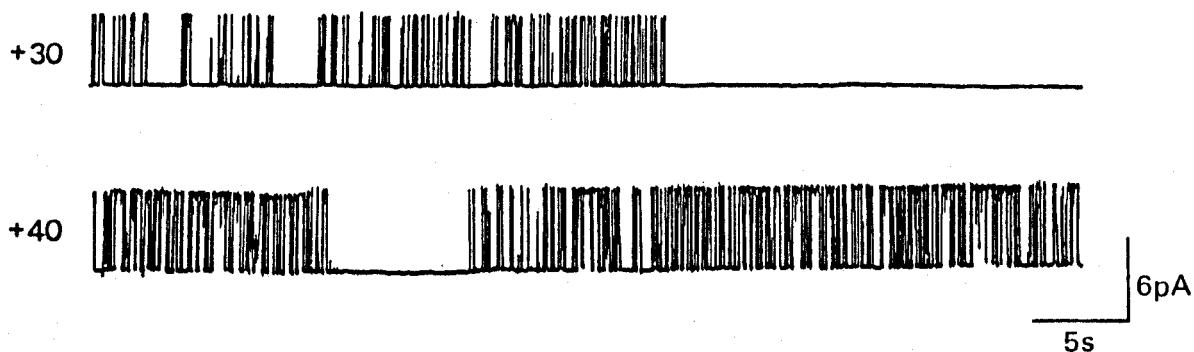


Figura 45. Periodos silentes prolongados del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ . Registro continuo "in situ" a 30 y 40 mV de despolarización sobre el potencial de membrana.

parte superior de la misma, el canal durante la fijación mantenida del voltaje a +30 mV sobre el potencial de membrana pasó de estado abierto a cerrado de forma regular durante 30 s, siendo durante este periodo la probabilidad de estar abierto de 0,2. Después de este tiempo, el canal se hizo silente hasta que después de 22 s se cambió de nuevo el voltaje a +40 mV. El registro inferior es continuación del anterior, y en él se observa que el canal nuevamente pasó regularmente de estado abierto a cerrado pero después de 12 s se hizo otra vez silente durante 7 s, tras este periodo volvió espontáneamente a la actividad anterior con una  $P(a)$  de aproximadamente de 0,4.

Periodos silentes tan prolongados sugieren que el canal puede entrar en un estado de inactivación. Este estado puede ser el responsable del fenómeno de inactivación observado en el componente dependiente de calcio de la corriente de  $K^+$  en otras preparaciones (Heyer y Lux, 1976a,b; Gorman y Thomas, 1980). Un estudio más detallado de las características de estos estados silentes así como de las condiciones que hacen que se produzcan puede ser, por tanto, de interés.

### 2.5. Selectividad y efecto de otros iones

El principio de independencia postulado por Hodgkin y Huxley (1952) considera que el paso de un ión a través de un canal no se ve afectado por la presencia del resto de iones presentes en el medio, incluso por los del mismo tipo. No obstante, mediante el registro directo de la corriente a través de un canal se ha comprobado que ninguno de los canales hasta ahora registrados cumple totalmente este principio pudiéndose producir, por el contrario, fenómenos de saturación, bloqueo y competición entre los distintos iones (Hille, 1984).

En el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de las células Y-1 se observan fenómenos de saturación y bloqueo pero no de competición; esto último, se debe posiblemente a la gran selectividad de este canal para los iones de  $K^+$ . Esta gran selectividad ha sido ampliamente estudiada en canales del mismo tipo en neuronas de "Aplysia" (Gorman y col., 1982); células cromafines (Yellen, 1984) y en miocitos (Blatz y Magleby, 1984).

El efecto sobre el canal de K<sup>+</sup> activado por calcio en células Y-1 de la sustitución de prácticamente la totalidad de los iones de K<sup>+</sup> a un lado o a otro de la membrana por iones de Na<sup>+</sup> se estudió en membranas escindidas. Se compararon las amplitudes de las corrientes registradas a través del canal en estas soluciones con los valores teóricos de las mismas para un canal muy selectivo para el K<sup>+</sup>; estos últimos se calcularon mediante la utilización de una derivación de la ecuación de la corriente (9) de Goldman-Hodgkin-Katz (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949; Blatz y Magleby, 1984):

$$i_{K2} = i_{K1} \frac{[K]_o - P_{Na}/P_K \cdot [Na]_o \cdot \exp(VF/RT)}{[K]_o \cdot (1 - \exp(VF/RT))} \quad (9)$$

donde  $i_{K2}$  es la corriente teórica que pasaría por un canal de K<sup>+</sup> muy selectivo para este ión y con soluciones asimétricas de K<sup>+</sup>;  $i_{K1}$  la corriente de K<sup>+</sup> que se registra a través del canal con soluciones simétricas de 130 mM K<sup>+</sup>;  $P_{Na}/P_K$  la permeabilidad relativa del canal para los iones de Na<sup>+</sup> (se consideró el valor referido por Blatz y Magleby (1984) de 0,01),  $F/RT = 0,0394 \text{ mV}^{-1}$ ,  $[K]_o$  concentración de K<sup>+</sup> en experimentos con soluciones simétricas (130 mM),  $[K]_i$  idem con soluciones asimétricas (130 mM),  $[Na]_o$  idem (140 mM).

En la Figura 46 se muestran registros representativos de la corriente a través del canal con soluciones asimétricas de K<sup>+</sup>. Los registros en A se



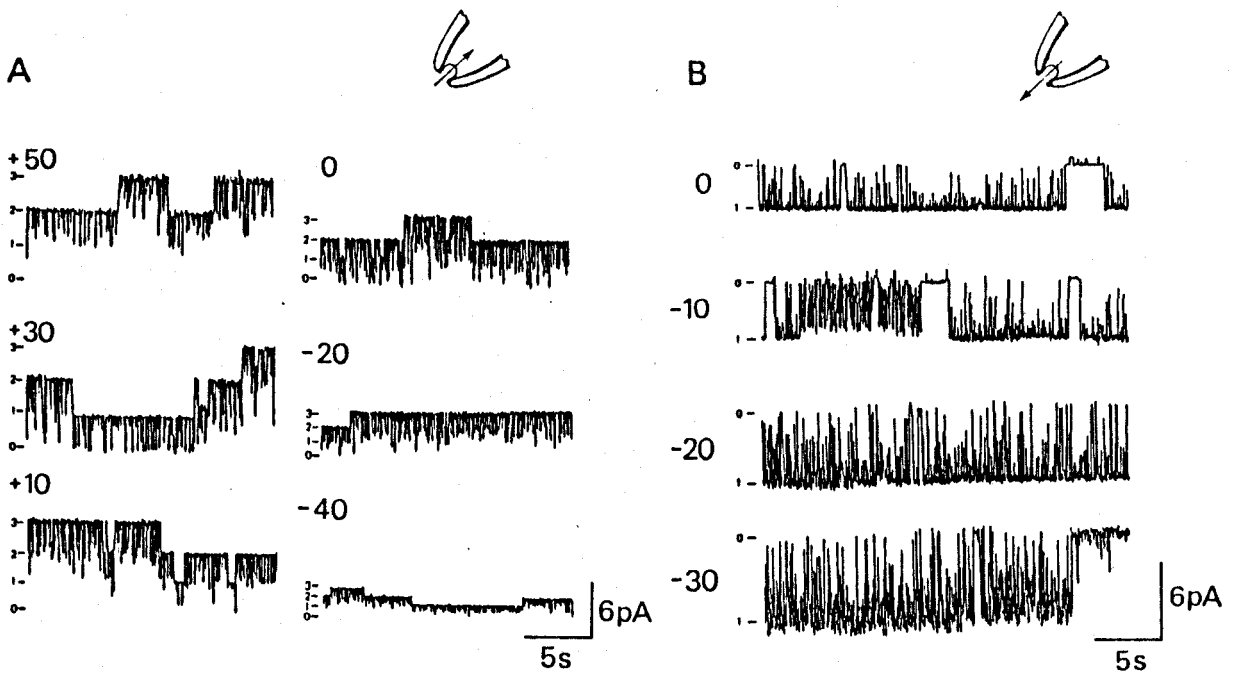


Figura 46. Registro de la corriente a través de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  con soluciones asimétricas (véase texto). En A, donde hay alto  $K^+$  en el lado interno y alto  $Na^+$  en la pipeta, se observa corriente hacia fuera desde  $-40$  a  $+50$  mV y de amplitud progresivamente creciente. En B, donde existe una situación iónica inversa a la anterior, se observa corriente hacia dentro con potenciales de membrana desde  $0$  a  $-30$  mV.

obtuvieron en un experimento con alto  $Na^+$  en el lado externo y alto  $K^+$  en el lado interno ( $140$  mM  $Na^+$  //  $130$  mM  $K^+$ ); en esta situación a  $0$  mV se registra corriente hacia fuera (de la solución del baño a la de la pipeta) que aumenta en amplitud con variaciones del voltaje en el sentido de la despolarización y disminuye con variaciones en el sentido contrario. En B se muestra la corriente registrada con soluciones con alto  $K^+$  en el lado externo y alto  $Na^+$  en el interno ( $130$  mM  $K^+$  //  $140$  mM  $Na^+$ ); en este caso se observa corriente hacia dentro a  $0$  mV cuya amplitud aumenta a medida que se hiperpolariza el potencial de membrana.

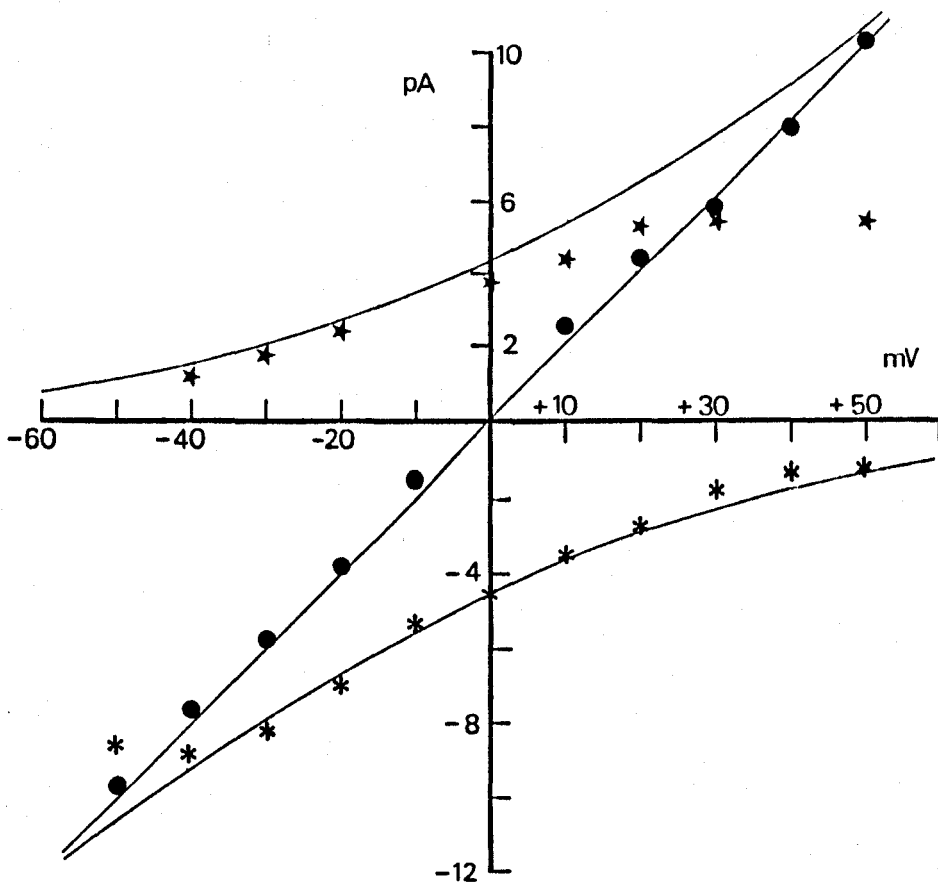


Figura 47. Relación I/V del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  en 3 situaciones iónicas distintas. Con círculos se representa la amplitud de la corriente a través del canal con soluciones simétricas de 130 mM  $K^+$ . Las estrellas y los asteriscos corresponden a observaciones experimentales en soluciones asimétrica (estrellas: 140  $Na^+$ //130  $K^+$ , asteriscos: 130  $K^+$ //140  $Na^+$ ); las líneas continuas representan los valores teóricos de la corriente para un canal 100 veces más selectivo al  $K^+$  que al  $Na^+$  (véase texto).

En la gráfica I/V de la Figura 47 se han representado con distintos símbolos los valores de la amplitud de la corriente a través del canal en tres situaciones iónicas distintas. Los círculos corresponden a experimentos realizados con soluciones simétricas de alto  $K^+$  (130 mM), los asteriscos con soluciones 130  $K^+$ //140  $Na^+$  y las estrellas con soluciones 140  $Na^+$ //130  $K^+$ . En el caso de los experimentos realizados con soluciones asimétricas los valores teóricos de la corriente para cada voltaje, calculados según la ecuación (9), se han representado por una línea continua. En la gráfica se observa que en la situación 130  $K^+$ //140  $Na^+$  los valores de

la amplitud de la corriente son similares a los calculados teóricamente para un canal muy poco permeable al  $\text{Na}^+$ , aunque, a voltajes más negativos de  $-30$  mV se observa una menor amplitud de la corriente registrada con respecto a los valores calculados, lo que posiblemente se debe a un efecto de saturación de la corriente a ese nivel o a bloqueo del canal por los iones de  $\text{Na}^+$  (véase apartado 2 de "Discusión").

Con soluciones  $140 \text{ Na}^+//130 \text{ K}^+$ , se observa que los valores reales de la corriente solo se aproximan a los teóricos a voltajes negativos. Este fenómeno puede explicarse por un bloqueo voltaje dependiente del canal por los cationes presentes en la solución interna, principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (en el ejemplo que se muestra en la figura 47 existía  $10 \text{ mM Na}^+$  y  $1 \text{ mM Ca}^{2+}$ ). Estos cationes tienden a entrar más fácilmente en el canal a medida que el voltaje se hace más positivo, dando lugar a una disminución efectiva de la corriente de  $\text{K}^+$  a través del canal (véase apartado 2 de "Discusión").

En la Figura 40 se observa así mismo que con soluciones simétricas de  $\text{K}^+$  la conductancia del canal deja de ser lineal para voltajes superiores a  $+50$  mV e inferiores a  $-50$  mV. Esto se observó en la mayoría de los experimentos aunque, con pequeñas variaciones en relación con el voltaje al cual empezó la rectificación. Este hecho puede ser debido al efecto bloqueante de los iones de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Ca}^{2+}$  o a la saturación de la corriente a estos voltajes.

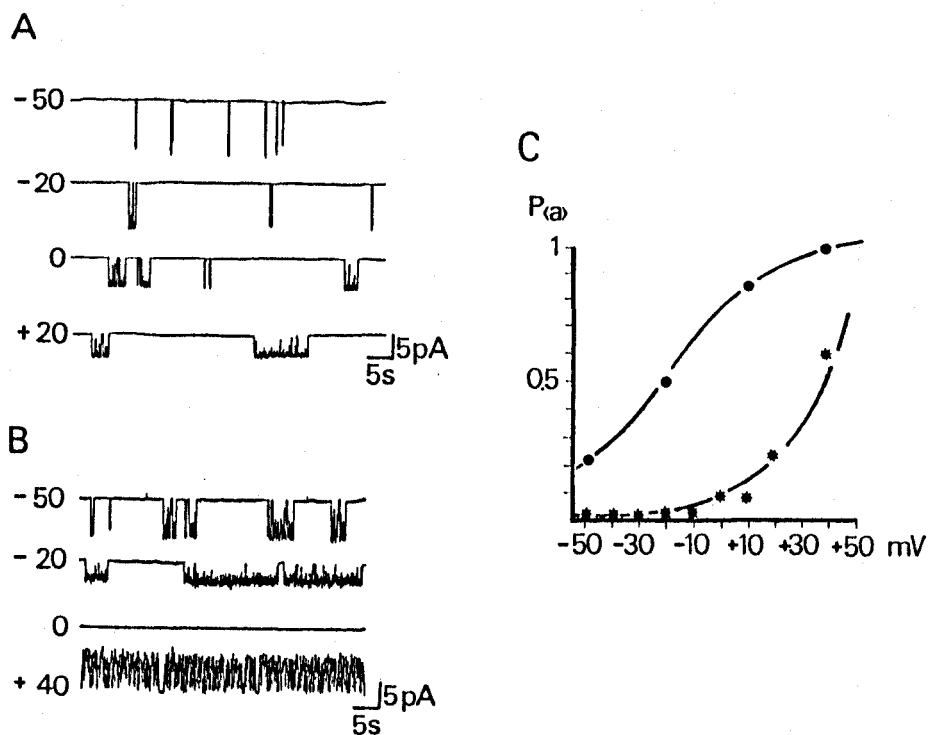


Figura 4B. Efecto de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  sobre la actividad de un canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$ . Registro con 140 mM  $\text{Na}^+$  en el lado interno de la membrana. B. Registro en 130 mM  $\text{K}^+$ , 10 mM  $\text{Na}^+$ . Solución en la pipeta en ambos casos: 130 mM  $\text{K}^+$ , 10  $\text{Na}^+$ , 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ . C. Representación gráfica de la  $P(o)$  en función del potencial de membrana del registro en A (estrellas) y B (círculo).

Además del efecto descrito de otros iones distintos del  $\text{K}^+$  sobre la conductancia del canal, se observó que estos también afectan al tiempo que el canal permanece abierto. En la Figura 4B se muestra un experimento realizado en un mismo área de membrana escindida donde se registró la actividad del canal a distintos potenciales de membrana, primero con alto  $\text{Na}^+$  en el lado interno de la membrana (registros en A), y posteriormente con alto  $\text{K}^+$  en la misma (registros en B). La solución en la pipeta en ambos casos fue constante (130 mM  $\text{K}^+$  y 1  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ). Si se

compara la actividad del canal en ambas soluciones se observa que en A es mucho menor que en B, lo que se puede objetivizar de forma cuantitativa en la gráfica en C. Esta gráfica representa la  $P(a)$  del canal en función del potencial de membrana en cada una de las situaciones anteriores; obsérvese que mientras que con alto  $\text{Na}^+$  en la solución interna la probabilidad del canal de abrirse es prácticamente cero a potenciales negativos, va aumentando progresivamente a medida que se despolariza la membrana. Esto se debe a que a potenciales negativos el canal es bloqueado por los iones de  $\text{Na}^+$  de la solución externa (véase apartado 2 de "Discusión"). Cuando el  $\text{Na}^+$  se reemplaza por  $\text{K}^+$  el tiempo que el canal permanece abierto es mucho mayor, presentando en este caso una dependencia del voltaje muy próxima a lo esperado a esta  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (véase Figura 39).

#### 2.6. Densidad de canales de $\text{K}^+$ activados por $\text{Ca}^{2+}$

La distribución de estos canales en la membrana de las células Y-1 es muy homogénea ya que aparecieron en más del 99 % de las microáreas de membranas aisladas en este estudio. El número de estos canales en cada registro osciló generalmente entre 1 y 5, pudiéndose deber esta diferencia a variaciones en el tamaño de la apertura del electrodo más que a diferencia de densidad de los mismos. El diámetro de la apertura de los electrodos se midió mediante un microscopio de barrido y osciló entre 0,25-1  $\mu\text{m}$ ; el área de membrana se calculó según las estimaciones

de Sakmann y Neher (1983) en  $1 \mu\text{m}^2$ . Basándonos en los datos anteriores, y considerando una media de 3 canales por registro y un diámetro medio de estas células de  $12 \mu\text{m}$ , se calculó que el número de canales de  $\text{K}^+$  de gran conductancia activados por  $\text{Ca}^{2+}$  por célula Y-1 es de aproximadamente 1000- 1500.

### 2.7. Otros canales de $\text{K}^+$

Además del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  de gran conductancia se registraron otros canales que se identificaron como de  $\text{K}^+$  en base a la dirección de la corriente. La aperturas y cierres de estos canales aparecieron generalmente superpuestas a las de

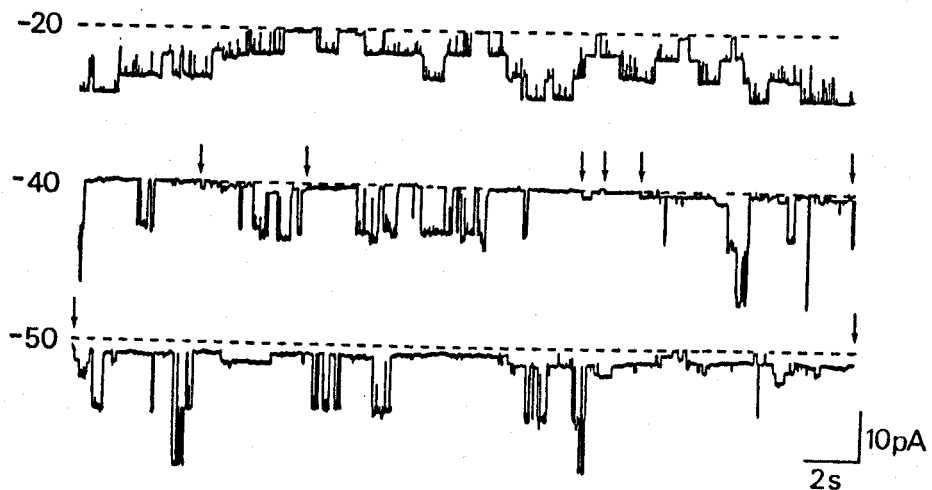


Figura 49. Registros de corrientes a través de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  y de corrientes de menor amplitud e igual dirección (algunas de estas últimas se señalan con flechas). Obsérvese como a medida que se hiperpolariza la membrana aumenta la amplitud de la corriente a través de los canales de menor conductancia así como el tiempo que permanecen abiertos. Registro realizado en una membrana escindida y con soluciones simétricas de  $130 \text{ mM K}^+$ .

los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (véase Figura 49) y se diferenciaron de éstas últimas por la menor amplitud de la corriente. Estos canales son de muy pequeña conductancia (aprox. 30 pS en soluciones simétricas de 130 mM  $K^+$ ) y su estudio en un futuro, previo bloqueo del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de gran conductancia, puede ser de interés.

## DISCUSION

### 1. Características electrofisiológicas de las células adrenocorticales

En la última década, el desarrollo de las técnicas electrofisiológicas ha permitido estudiar los fenómenos eléctricos en gran número de células secretoras y analizar el posible papel de éstos en el proceso de acoplamiento estímulo-secreción (véase Petersen, 1980). En la actualidad existen numerosos datos en relación con los tipos de permeabilidades iónicas y conductancias activas presentes en la membrana de algunas células secretoras, así como sobre las modificaciones de estas conductancias por los estímulos fisiológicos para la secreción. Las células endocrinas hasta ahora mejor conocidas son las cromafines (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980; Fenwick y col., 1982a, b; Marty, 1981), beta del páncreas (Dean y Matthews, 1968 y 1970; Meissner y Schmelz, 1974; Matthews y Sakamoto, 1975a, b; Meissner, 1976; Atwater y col., 1978 y 1979; Ashcroft y col., 1984; Cook y Hales, 1984) y algunos tipos celulares de la adenohipófisis (Kidokoro, 1975; Biales y col., 1977; Taraskevich y Douglas, 1980; Ozawa y Kimura, 1982; Hagiwara y Ohmori, 1982; Matteson y Armstrong, 1984).

En relación con la electrofisiología de células adrenocorticales, la información disponible hasta el momento es muy escasa ya que los resultados obtenidos en los pocos estudios realizados al respecto son en muchos



aspectos incompletos y, por lo tanto, poco concluyentes. No obstante, al igual que en otros tipos de células endocrinas, los fenómenos eléctricos que se generan en células adrenocorticales pueden tener un papel funcional importante.

El potencial de membrana medio registrado con electrodos intracelulares en las células Y-1 en cultivo fue de  $-68 \pm 12,9$  mV, valor muy similar al medido previamente por Matthews y Saffran (1968 y 1973) en la glándula suprarrenal completa mantenida "in vitro", y al registrado en otros tipos de células endocrinas como, por ejemplo, en células paratiroideas (López Barneo y Armstrong, 1983, véase también "Introducción").

En células adrenocorticales Y-1 la inyección de pulsos cuadrados de corriente positiva a través del microelectrodo de registro produjo el disparo repetitivo de potenciales de acción de 55-140 mV de amplitud y de duración muy variable. Estos potenciales se caracterizaron por tener una fase de despolarización lenta, similar a la descrita como potencial marcapaso en otras células (Brown y DiFrancesco, 1980), una fase de subida durante la espiga del orden de 18 V/s, una meseta de duración variable y una repolarización también lenta del orden de 41 V/s que se continúa con una pequeña posthiperpolarización. Las variaciones en la duración de los potenciales de acción se debieron sobre todo a una

prolongación de la fase de meseta ante pequeños incrementos en la amplitud de la corriente inyectada o ante estímulos repetitivos.

En registros realizados en células adrenocorticales en una preparación "in vitro" de la glándula suprarrenal, Matthews y Saffran (1973) observaron que en presencia de ACTH y ausencia de K en la solución de perfusión algunas células generaban potenciales de acción de 10-60 mV de amplitud y de 600-1,800 ms de duración. La actividad registrada en las células Y-1 amplía esta observación sobre la excitabilidad de las células adrenocorticales.

El patrón de actividad eléctrica que se observó en células adrenocorticales es en muchos aspectos distinto del que se genera en otras células endocrinas excitables. La amplitud y duración de los potenciales de acción registrados en células adrenocorticales es superior al observado en células cromafines (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980); células beta (Dean y Matthews, 1970; Meissner, 1976) y células de la adenohipófisis (Kidokoro, 1975; Biales y col., 1977). La morfología de los potenciales de acción en células Y-1 se asemeja más a la actividad registrada en células del nódulo sinusal del corazón (Noble, 1984). Este hecho se debe probablemente al tipo de conductancias que participan en esta respuesta. En células adrenocorticales, los potenciales de acción se deben

fundamentalmente a la activación de una conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  (véase más adelante) y el componente de  $\text{Na}^+$ , si existe, es muy pequeño.

Una de las características más llamativas de los potenciales de acción registrados en células Y-1 es el aumento de la duración de éstos ante pequeños incrementos en la cantidad de corriente inyectada o ante la estimulación repetida. Este fenómeno, que no parece deberse a daño celular ya que en la mayoría de los registros donde se observó revirtió pasando menor cantidad de corriente, podría deberse a un aumento progresivo de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Bourque y Renaud, 1985; López Barneo y Llinás, en preparación) o a una inactivación de la corriente repolarizante (Heyer y Lux, 1976a, b; Gorman y Thomas, 1980). Si la repolarización en estas células se produce fundamentalmente por la activación de la conductancia al  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la duración de los potenciales de acción podría en el último caso estar en función del grado de activación o inactivación de la misma. Periodos de inactividad prolongados (sobre todo a voltajes positivos o con alto  $\text{Ca}^{2+}$ ) se han descrito en el canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en células del músculo estriado (Barrett y col., 1982), células acinares del páncreas (Maruyama y col., 1983), en canales procedentes de células musculares incluidos en bicapas lipídicas (Latorre y col., 1982 y 1983; Moczydlowski y Latorre, 1983) y han sido también observados en células Y-1.

## 2. Conductancias iónicas en células adrenocorticales

### 2.1. Conductancia al $\text{Ca}^{2+}$

La caracterización de la conductancia despolarizante responsable de la producción de los potenciales de acción en células Y-1 se ha llevado a cabo con la técnica de registro intracelular mediante el uso de bloqueantes específicos y la sustitución de iones en el medio extracelular.

La adición de TTX o la sustitución del  $\text{Na}^+$  por  $\text{Tris}^+$  no afectó a los potenciales de acción registrados en células Y-1. Sin embargo, éstos se bloquearon con  $\text{Co}^{2+}$  extracelular. Estos potenciales de acción se deben por lo tanto a la activación de una conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$ .

La existencia de una conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  también lo corrobora el hecho de que la sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Ba}^{2+}$  en la solución externa disminuyó el umbral de disparo y aumentó la duración de los potenciales de acción. La disminución del umbral y el aumento de la duración se debe a que los iones de  $\text{Ba}^{2+}$  permean mejor por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que el mismo  $\text{Ca}^{2+}$  (Hagiwara y col., 1974) y que tanto los canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Vergara y Latorre, 1983; Latorre y col., 1983; Yellen, 1984) como los de rectificación retrasada (Armstrong y col., 1982), responsables de la repolarización del potencial de acción, se bloquean por  $\text{Ba}^{2+}$ .

Asumiendo que la célula es isopotencial y que la fase de despolarización del potencial de acción se debe

exclusivamente a la activación de una conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$ , la amplitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  puede estimarse de acuerdo con la fórmula:

$$i = - C \cdot dV/dt \quad (10)$$

considerando una capacidad específica de la membrana de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Cole, 1968) y un diámetro medio celular de  $12 \mu\text{m}$ . El valor obtenido fue de  $81 \text{ pA}$  que es una cifra próxima a la amplitud máxima de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  registrada en condiciones de fijación de voltaje en otras preparaciones con concentraciones equivalentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Matteson y Armstrong, 1984).

El registro y análisis de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en células adrenocorticales mediante la técnica de "patch clamp" (configuración de "whole cell") puede ser de interés, tanto desde el punto de vista biofísico (existencia o no de dos tipos distintos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , cinética, etc) como funcional, dada la posible participación de esta conductancia en la regulación de la secreción en las células adrenocorticales (véase más adelante). Este es uno de los principales objetivos de la labor experimental que se ha planificado tras la finalización del presente trabajo.

## 2.2. Conductancia al $\text{K}^+$ activada por $\text{Ca}^{2+}$

En el presente trabajo se ha identificado un canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el registro de la corriente a

través de canales individuales con la técnica de "patch clamp".

Las características generales del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  registrado en células adrenocorticales Y-1 son similares a las descritas para el mismo canal en células cromafines (Marty, 1981; Yellen, 1984), células embrionarias de músculo de rata (Barrett y col., 1982; Magleby y Pallotta, 1983a, b; Blatz y Mableby, 1984), células de glándulas salivares (Maruyama y col., 1983), células de glándulas lagrimales (Findlay, 1984); lo cual, muestra la amplia distribución de este canal en diferentes tipos de células de vertebrados.

La conductancia del canal en soluciones simétricas de 130 mM  $K^+$  a 20-25 °C fue de  $181,5 \pm 52,9$  pS, con un valor mínimo de 110 y máximo de 314 pS. Este mismo canal en músculo esquelético presenta una conductancia de 220 pS a 20 °C en soluciones simétricas de 144 mM  $K^+$  (Barrett y col., 1982) y de 265 pS en células cromafines a 20-22 °C, con soluciones simétricas de 160 mM  $K^+$ , presentando en este último caso un rango de variación en la conductancia de 190-330 pS (Yellen, 1984). La variabilidad en el valor de la conductancia de este canal en un mismo tipo celular ha sido referida por distintos autores (Methfessel y Boheim, 1982; Barrett y col., 1982) y puede ser debida a distintas causas como, por ejemplo, la posible heterogeneidad entre canales del mismo tipo (Methfessel y Boheim, 1982) o la influencia de distintos

factores externos como la temperatura (Barrett y col., 1982). Estos últimos autores han calculado que la conductancia del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  en células musculares embrionarias varía unos 54 pS por cada 10 °C de cambio en la temperatura en la solución de registro. Así mismo, la conductancia del canal podría verse modificada por la existencia de cargas negativas fijas en la membrana que influenciarían la concentración iónica en las inmediaciones del canal (Frankenhaeuser y Hodgkin, 1957; McLaughlin y col., 1971) y por tanto la conductancia (Yellen, 1984). La dispersión de los valores de la conductancia observados experimentalmente podría ser consecuencia de la variabilidad en el número y la distribución de cargas fijas de la membrana en los distintos parches.

En soluciones simétricas de alto  $K^+$  la conductancia del canal fue lineal para voltajes comprendidos entre  $\pm 50$  mV; para valores más extremos, la conductancia disminuyó (véase Figura 40). Este tipo de sublinealidad se ha observado en otras preparaciones y se ha propuesto que se debe a saturación de la corriente que pasa por el canal, o a cambios en las características de permeabilidad del canal a voltajes extremos (Yellen, 1984). En el caso del canal de las células adrenocorticales esta disminución de la conductancia podría explicarse por bloqueo por iones de  $Na^+$  (véase más adelante).

Al igual que el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  en células de músculo en cultivo (Barrett y col., 1982), el valor de la conductancia del canal en células adrenocorticales no varió con cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ , de 1-50  $\mu M$ . Sin embargo, en células cromafines (Marty, 1981) y en neuronas de "Aplysia" (Heyer y Lux, 1976b) se ha descrito para este mismo canal una disminución de la conductancia en presencia de alto  $Ca^{2+}_i$ . En células cromafines se ha explicado posteriormente que la disminución de la conductancia se debió a la disminución de la actividad de los iones de  $K^+$  en la solución debido a la alta concentración de EGTA utilizada (Marty, 1983 b).

El canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  identificado en células Y-1 es uno de los de mayor conductancia dentro de los distintos tipos de canales iónicos estudiados hasta la fecha. Dado que este canal parece tener una gran selectividad para los iones de  $K^+$  (véase más adelante) existe pues la interrogante acerca de la organización molecular que permite la conjunción de ambas características (véase Latorre y Miller, 1983).

Otra de las características del canal es su dependencia del voltaje. En experimentos realizados en "cell attached" la probabilidad del canal de estar abierto ( $P(a)$ ) varió, para pequeñas despolarizaciones, e veces por cada 7-10 mV. En células de músculo en cultivo la dependencia del voltaje de este canal "in situ" varió e veces por cada 15 mV de despolarización (Barrett y



col., 1982); esta diferencia puede deberse en parte a que en los experimentos realizados en células adrenocorticales la  $[Ca^{2+}]$  en la micropipeta fue similar a la fisiológica mientras que la usada por Barrett y col. fue marcadamente menor y, por tanto, en el primer caso pudo haberse producido entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales para este ión incluidos en el parche de membrana. En neuronas de "Aplysia" se ha observado una sensibilidad de la corriente de  $K^+$  dependiente de  $Ca^{2+}$  aún menor (25 mV para un cambio de e veces, Gorman y Thomas, 1980). La dependencia del voltaje del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$ , aunque alta, es inferior a la calculada para los canales de  $Na^+$  y  $K^+$  en el axón gigante del calamar por Hodgkin y Huxley (1952) (4 y 5 mV, respectivamente). En el canal acoplado al receptor de ACh, que es un ejemplo típico de canal no dependiente del voltaje, se ha calculado, por el contrario, que es necesario un cambio de 80-125 mV (dependiendo de la temperatura) para cambiar e veces la probabilidad de estar abierto (Magleby y Stevens, 1972; Neher y Sakmann, 1976).

La sensibilidad del canal a la  $[Ca^{2+}]$ , se estudió en membranas escindidas y se puso de manifiesto por el incremento de tiempo que un canal permaneció abierto y por el mayor número de canales activos en un mismo microárea de membrana ante incrementos de la concentración interna de este catión. Por el contrario, variaciones en la  $[Ca^{2+}]$ , no modificaron la actividad de los canales al

igual que ocurre en células cromafines (Marty, 1981) y células de músculo embrionario (Pallotta y col., 1981; Barrett y col., 1982). La variación de la actividad del canal para una determinada  $[Ca^{2+}]_i$ , con el potencial de membrana en células adrenocorticales es similar cualitativamente a lo observado en canales del mismo tipo (Barrett y col., 1982). En todos los casos se observó un aumento de la  $P(a)$  a medida que se despolarizó la membrana. A  $[Ca^{2+}]_i$  similares o ligeramente superiores a las fisiológicas se observó una gran dependencia del potencial de membrana, actuando en este caso el voltaje como modulador de la activación del canal por el  $Ca^{2+}$ . Por el contrario, a concentraciones extremas de  $Ca^{2+}$  (50  $\mu M$  ó 0,01  $\mu M$ ) la variación de la  $P(a)$  en un amplio rango de potenciales de membrana fue muy pequeña. Desde el punto de vista cuantitativo, no obstante, existen algunas diferencias en el grado de activación de este canal de  $K^+$  para una misma  $[Ca^{2+}]_i$ , en las distintas preparaciones. En células Y-1 el canal tiene una  $P(a)$  de 0,5 a -40 mV con 1  $\mu M$   $Ca^{2+}$ , mientras que en adenohipófisis esta  $P(a)$ , para la misma concentración de  $Ca^{2+}$ , se alcanza a -20 mV (Wong y col., 1982). En células de músculo en cultivo son necesarios 8  $\mu M$   $Ca^{2+}$  y -20 mV para alcanzar la misma  $P(a)$  (Methfessel y Boheim, 1983). El observar distintos grados de sensibilidad al  $Ca^{2+}$ , entre diferentes tipos de células no es sorprendente ya que incluso para un mismo tipo celular, y en condiciones

experimentales similares, se observan variaciones en este sentido. Barrett y col. (1982) en experimentos prolongados han observado una variación de la  $P(a)$  en un mismo canal de hasta 40%. Por otro lado, Blair y Dionne (1985) han estudiado en neuronas espinales en cultivo la sensibilidad al canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  de gran conductancia, encontrando una clara correlación de las variaciones de ésta con la etapa del ciclo celular. En células mantenidas en cultivo (sobre todo en líneas clonales), donde las divisiones son frecuentes, esta observación puede en parte explicar las variaciones entre células del mismo tipo y con otras de distinta procedencia.

Las características cinéticas del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  en las células adrenocorticales son similares a las observadas en canales del mismo tipo en otras preparaciones. Tanto en experimentos realizados en "cell-attached" como en membranas escindidas se observaron estados intermedios de conductancia. En células embrionarias de músculo Barrett y col. (1982) han descrito un subestado de conductancia de este canal, que representa el 40 % del estado normal y que suele aparecer cuando el canal está previamente abierto. En canales del mismo tipo incorporados en bicapas lipídicas y procedentes de túbulos transversos de músculo, Latorre y col. (1983) han descrito un estado intermedio de conductancia del 50 %; este subestado aparece rara vez y parece ser independiente del voltaje y de la  $[Ca^{2+}]$ .

En células adrenocorticales hemos observado dos subestados distintos (ambos pueden aparecer en un mismo canal), uno que conduce entre el 25-35 % y que suele aparecer partiendo del estado cerrado del canal y otro del 55 % que se observa tras una apertura previa del canal. Subestados de conductancia han sido descritos también en otros tipos de canales como en canal del receptor de ACh de músculo en cultivo (Hamill y Sakmann, 1981; Auerbach y Sachs, 1982; Chabala y col., 1982), el canal de  $K^+$  en el retículo sarcoplásmico (Labarca y Miller, 1981), el canal de  $Cl^-$  en electroplacas de "Torpedo" (Tank y col., 1982) y el canal de  $K^+$  sensible a serotonina en neuronas de "Aplysia" (Siegelbaum y col., 1982).

Aunque en la mayoría de las preparaciones donde se ha registrado el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  se han observado aperturas y cierres que se distribuyen en forma de brotes, el estudio detallado de este tipo de cinética se ha realizado fundamentalmente en células de músculo en cultivo (Magleby y Pallotta, 1983a b). En estos canales, al representar gráficamente las distribuciones de frecuencias de la duración de los periodos que el canal permanece cerrado o abierto, son necesarias varias exponenciales para realizar un ajuste adecuado de las mismas, lo cual sugiere que el canal posee más de un estado cerrado y abierto (Magleby y Pallotta, 1983 a, b). En células adrenocorticales, un estudio cuantitativo de este tipo de fenómenos no ha

sido posible debido a la limitada respuesta de frecuencia de nuestro sistema de registro.

Periodos de inactividad prolongados como los que se muestran en la figura 45 han sido también observados en canales del mismo tipo en otros tipos celulares. Por ejemplo, Maruyama y col. (1983b) han descrito en células acinares del páncreas estados similares a voltajes positivos. Así mismo, Latorre y col. (1982 y 1983) han observado también este fenómeno en canales incluidos en bicapas lipídicas y procedentes de túbulos transversos de músculo esquelético; la aparición de estos periodos silentes prolongados suele ser más frecuente a voltaje positivos y con alto  $\text{Ca}^{2+}$ . Si este fenómeno se relaciona con la inactivación de la corriente de  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  observado en neuronas de caracol (Heyer y Lux, 1976a, b) y de "Aplysia" (Gorman y Thomas, 1980) queda aún por determinar.

La selectividad del canal al  $\text{K}^+$  en relación al  $\text{Na}^+$  y el efecto bloqueante de este último ión se estudiaron con soluciones donde el  $\text{K}^+$  en un lado de la solución se sustituyó por  $\text{Na}^+$ . En soluciones asimétricas se utilizó la ecuación de la corriente de GHK para comparar los valores teóricos de la misma, para un canal muy selectivo para el  $\text{K}^+$ , con los obtenidos en las observaciones experimentales a distintos voltajes. Como se aprecia en la figura 46 en el caso de experimentos realizados con alta

concentración de  $K^+$  en el lado externo y alto  $Na^+$  en el interno, los valores experimentales se ajustaron bien a los teóricos aunque, a voltajes muy negativos (-40, -50 mV), se apreció una desviación de la corriente registrada con respecto a la curva teórica. Con iguales soluciones, pero en la situación inversa, los valores experimentales se ajustaron a lo calculado solo a voltajes más negativos de cero, mientras que a medida que se despolarizó éstos se desviaron progresivamente más de la curva teórica.

Las desviaciones observadas de los valores teóricos pueden explicarse por un fenómeno de bloqueo dependiente del voltaje producido por los iones de  $Na^+$ . En la Figura 50 se muestra de forma esquemática distintas situaciones experimentales y el posible efecto de los iones de  $Na^+$  sobre la corriente de  $K^+$  a través de un canal muy selectivo para este ión y prácticamente impermeable al  $Na^+$ . Con puntos negros se representan los iones de  $Na^+$  y con puntos blancos los de  $K^+$ . En la parte superior de la figura se representa la situación experimental de alto  $K^+$  en el lado externo y alto  $Na^+$  en el interno a potenciales de membrana positivos (A) y negativos (B). En la parte inferior de la misma la situación iónica inversa con la misma polarización de la membrana. El número de iones representados en cada caso es proporcional a la concentración de los mismos en los experimentos reales que se muestran en la gráfica I/V de la figura 47.

En la primera situación ( $130 \text{ K}^+$ ,  $10 \text{ Na}^+//140 \text{ Na}^+$ ), a potenciales positivos el  $\text{Na}^+$  de la solución interna tiende a entrar en la boca del canal siguiendo el gradiente eléctrico; el  $\text{K}^+$  del lado externo tiende, por el contrario a pasar a través del canal lado siguiendo en este caso el gradiente de concentración (para potenciales de membrana inferiores a  $E_K$ ). En experimentos de este tipo, a potenciales positivos no se observó disminución de la amplitud de la corriente a través del canal en relación con los valores calculados. En el esquema de la figura, el  $\text{Na}^+$  que pudiera estar en la boca interna del canal, y que no permea a través del mismo, es lavado por la corriente de  $\text{K}^+$  que fluye desde el lado externo al interno. A potenciales negativos (B), el  $\text{Na}^+$  presente en la solución externa es electrostáticamente empujado con mayor fuerza hacia la boca del canal a medida que el potencial de membrana se hace más negativo, al igual que el  $\text{K}^+$ , que en este caso entra en el canal siguiendo los gradientes de concentración y eléctrico, dando lugar a un bloqueo progresivo del canal a medida que el potencial de membrana es más negativo, de lo cual resulta la disminución de la amplitud de la corriente de  $\text{K}^+$  (véase figura 47).

La parte inferior de la figura 50 ilustra la situación iónica inversa ( $140 \text{ Na}^+//130 \text{ K}^+$ ,  $10 \text{ Na}^+$ ). En este caso ocurre el mismo fenómeno pero a voltajes opuestos. A potenciales positivos (C), tanto los iones de  $\text{K}^+$  del lado

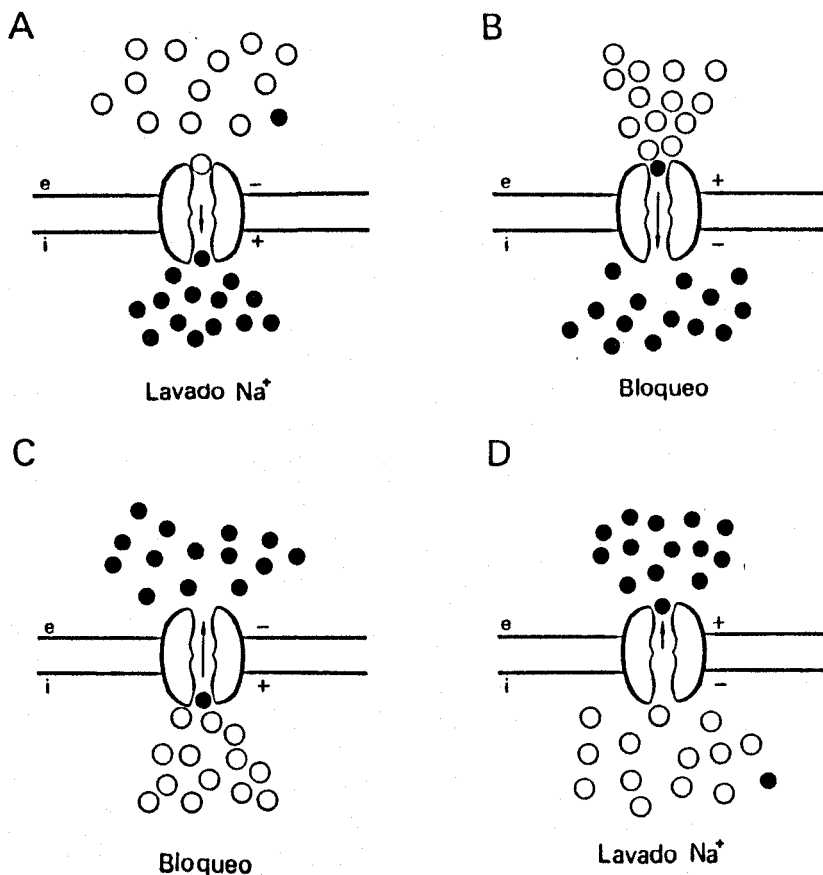


Figura 50. Posible efecto de los iones de  $\text{Na}^+$  sobre el canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en las distintas condiciones de registro. En la parte superior de la figura se esquematiza un registro en  $130 \text{ K}^+$ ,  $10 \text{ Na}^+//140 \text{ Na}^+$  a voltajes positivos (A) y negativos (B). En la parte inferior de la misma se muestra la situación iónica opuesta ( $140 \text{ Na}^+//130 \text{ K}^+$ ,  $10 \text{ Na}^+$ ) a voltajes positivos (C) y negativos (D). Los puntos negros representan los iones de  $\text{Na}^+$  y los blancos los de  $\text{K}^+$ . Para explicación véase texto.

interno como los de  $\text{Na}^+$  del mismo lado son atraídos hacia la boca interna del canal, dando lugar al  $\text{Na}^+$  a una disminución de la amplitud de la corriente proporcional al voltaje aplicado (se produce, por tanto, un bloqueo progresivamente mayor a medida que el potencial de membrana se hace más positivo, véase figura 47). En D, donde el voltaje es negativo en el lado interno con



respecto al externo, la corriente de  $K^+$  desde dentro hacia fuera lava el  $Na^+$  que pudiera entrar en la boca externa del canal siguiendo el gradiente eléctrico.

En la curva I/V representada con estrellas en la figura 47, se observa una reducción de la amplitud de la corriente a voltajes positivos superior a la que se aprecia a voltajes opuestos en la situación iónica inversa (asteriscos); esto se debe posiblemente a que en el primer caso (corriente hacia fuera) además de 10 mM  $Na^+$  en la solución interna existía una alta concentración de  $Ca^{2+}$  (1 mM), mientras que en segundo (corriente hacia dentro) en la solución externa era mucho menor (1  $\mu$ M). El efecto bloqueante del  $Ca^{2+}$  sobre el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  ha sido referido por distintos autores (Latorre y col., 1983; Marty, comunicación personal) y, al igual que el del  $Na^+$ , es dependiente del voltaje.

El efecto bloqueante de los iones de  $Na^+$  sobre el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  ha sido también observado en células cromafines (Marty, 1983a; Yellen, 1984) y en canales procedentes de células musculares incluidos en bicapas lipídicas (Latorre, 1983). La dependencia del voltaje de este fenómeno podría explicarse por una dificultad progresiva de los iones de  $Na^+$  una vez en la boca del canal a volver a la solución inicial a medida que aumenta el gradiente electroquímico para el  $K^+$ . Los iones de  $K^+$  tenderían en este caso a impedir la salida de los de  $Na^+$  con mayor fuerza a medida que aumenta

el voltaje. No obstante, un estudio sobre la dependencia del voltaje de la entrada y la salida de los iones de  $\text{Na}^+$  en este canal (Yellen, 1984) muestra que solo la entrada de  $\text{Na}^+$  es dependiente del voltaje, pero no la vuelta de este ión a la solución inicial. En este último caso, el bloqueo se explica en base a la teoría de difusión limitada (Laüger, 1976). Según esta teoría, cuando el gradiente electroquímico para el ión permeable y la velocidad de difusión son muy altos se produce la depleción en la entrada del canal de los iones que llevan la corriente; en esta situación el  $\text{Na}^+$  tiene una mayor probabilidad de acceder a la boca del canal y, por tanto, a bloquearlo (Yellen, 1984).

Como puede apreciarse en la figura 4B, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  no solo reducen la amplitud de la corriente de  $\text{K}^+$  a través del canal sino que dan lugar a una disminución de la  $P(a)$ . En el experimento representado en esta figura (véase composición de las soluciones en el pie de la misma) el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Ca}^{2+}$  de la solución externa dan lugar a una reducción del tiempo que el canal está abierto, proporcional al gradiente electroquímico para el  $\text{K}^+$ . Obsérvese que la  $P(a)$  es considerablemente menor en A que en B, siendo las concentraciones de estos dos cationes iguales en ambos casos; este fenómeno se explica por cualquiera de las dos teorías antes expuestas (dificultad progresiva de los iones bloqueantes para volver a la solución inicial a medida que el gradiente

electroquímico para el  $K^+$  aumenta o, mayor facilidad de acceso de estos iones a medida que aumenta la depleción de iones de  $K^+$  en la boca del canal conforme incrementa la velocidad de difusión). El ión responsable de la disminución de la  $F(a)$  en este caso es más probable que sea el  $Ca^{2+}$  que el  $Na^+$  ya que el primero es un bloqueante más lento que el segundo (Latorre y col., 1983), aunque, probablemente el fenómeno observado sea una combinación del efecto de ambos.

### 3. Posible papel de las conductancias iónicas en el proceso de acoplamiento estímulo-secreción

Los datos obtenidos en este estudio en relación con el tipo de conductancias iónicas presentes en la membrana de células adrenocorticales, complementan la abundante información existente desde el punto de vista bioquímico sobre estas células y aportan una visión más amplia sobre los mecanismos que regulan la secreción de hormonas esteroideas.

En la Figura 51 se muestra en un esquema la información biofísica y bioquímica disponible, con la finalidad de que una perspectiva global acerca de la fisiología de estas células sirva de ayuda en la construcción de hipótesis de trabajo encaminadas a esclarecer el papel de las conductancias iónicas en la secreción y cuales son los factores intracelulares que las activan y las regulan. Se han representado las conductancias identificadas hasta ahora (las mejor

caracterizadas hasta el momento son las de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$ ) y los cambios bioquímicos que tienen lugar durante la estimulación por el secretagogo y durante la secreción. En base a este esquema, en los párrafos siguientes se discuten algunos de los aspectos mejor conocidos sobre los mecanismos que intervienen en la estimulación de la esteroidogénesis y la liberación de hormonas esteroideas.

En la mayoría de las células endocrinas el mecanismo general de actuación de los secretagogos parece ser el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , bien por la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes o, bien por la estimulación de la liberación del mismo de almacenes intracelulares; este aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pone en marcha, en células que sintetizan hormonas peptídicas, un mecanismo común de secreción: la exocitosis (Douglas, 1968; Simpson, 1968). En células productoras de esteroides, por el contrario, el mecanismo de secreción no está claro existiendo hasta el momento dos hipótesis sobre el mismo: secreción por simple difusión y secreción por exocitosis. No existen hasta el momento evidencias experimentales que apoyen definitivamente una u otra teoría, pero sí algunas indicaciones indirectas. A favor de la primera está la solubilidad de los esteroides en la membrana citoplasmática y algunos trabajos que muestran que la tasa de secreción de algunas hormonas esteroideas es directamente proporcional al volumen de perfusión (Sibley

y col., 1980 y 1981). A favor de la segunda, la apreciación en estas células mediante microscopia electrónica, de vesículas rodeadas de membrana similares a los gránulos de secreción (Gemmel y col., 1977; Nussdofer y col., 1977; Pearce y col., 1977). No obstante, esta observación no ha sido corroborada por todos los estudios morfológicos (Sabatini y De Robertis, 1961; Luse, 1967; Bloodworthn y Powers, 1968).

Independientemente del mecanismo por el cual se produce la liberación de hormonas esteroideas (difusión o exocitosis), en células adrenocorticales se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  participa tanto en la biosíntesis como en la liberación de esteroides. En estas células existe muy poca cantidad de hormona almacenada siendo la mayor parte de la que se libera sintetizada en el momento de la estimulación por el secretagogo. La unión de la ACTH a su receptor en la membrana plasmática da lugar a un aumento intracelular de AMPc, a través de la activación de una adenilciclase, así como, posiblemente, a un incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanto AMPc como  $\text{Ca}^{2+}$  participan en distintas fases de la esteroidogénesis como es en la síntesis proteica (Ferguson, 1963), activación de las enzimas que producen la hidrólisis de los ésteres del colesterol (Boyd y Trzeciak, 1973; Beckett y Boyd, 1977; Hall y col., 1981) y activación y regulación de las enzimas que participan en la separación de la cadena lateral del colesterol en las mitocondrias (Kramer y col.,

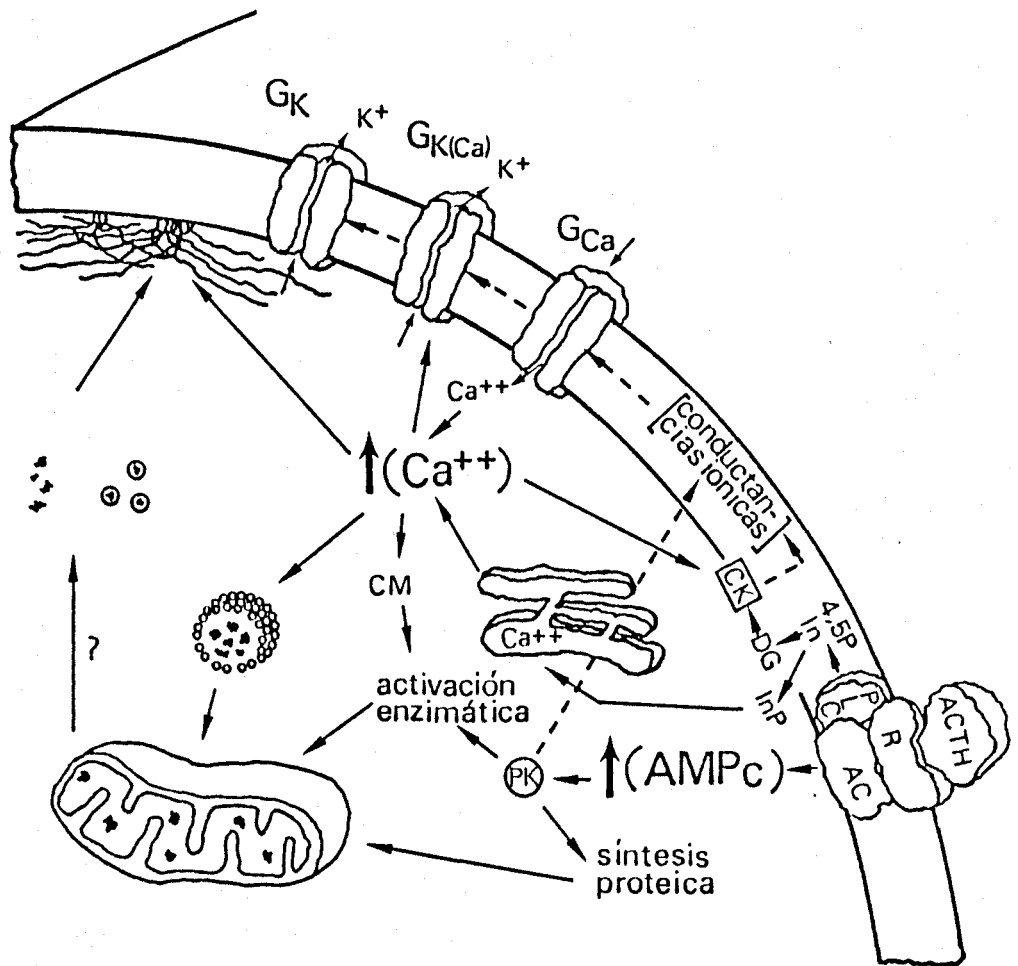


Figura 51. Esquema de los mecanismos que posiblemente forman parte del proceso de acoplamiento estímulo-secreción en una célula adrenocortical. En la membrana se han representado los canales iónicos hasta ahora identificados en estas células. La unión de la ACTH a su receptor de membrana activa una adenilciclase que a su vez da lugar a un aumento de los niveles intracelulares de AMPc. La activación de la proteincinasa dependiente de AMPc se sabe que regula la actividad de las enzimas que intervienen de la síntesis de pregnenolona en las mitocondrias, así como que activa la síntesis proteica. Un aumento de los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  parece también necesario para la activación de estos procesos así como para la liberación del colesterol incluido en gránulos de tubulina y, posiblemente para la depolimeración de los microfilamentos. El aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  se produce fundamentalmente por la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  incluidos en la membrana, aunque una pequeña parte puede proceder de almacenes intracelulares tras la producción de inositol fosfato por la activación de la fosfolipasa C. El control de la entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula se lleva a cabo fundamentalmente por la activación de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$ . El posible mecanismo por el cual las distintas conductancias iónicas se activan o modulan se representa por líneas discontinuas. Se han representado así mismo las dos hipótesis existentes acerca del mecanismo de liberación de las hormonas esteroideas (véase el texto para más explicación).

1982 y 1983; Ohashi y col., 1983). Además de participar en funciones comunes, existen interrelaciones entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el AMPc; el  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para la activación de enzimas que regulan a su vez a la adenilciclase (Fakunding y col., 1979; Nambi y col., 1982; Koletski y col., 1983).

El  $\text{Ca}^{2+}$  así mismo parece desempeñar un papel importante en la activación del mecanismo de transporte de colesterol a las mitocondrias, donde tiene lugar la síntesis de pregnenolona. Los ésteres de colesterol, una vez que han sido captados por la célula se separan de su receptor de membrana en los lisosomas y se almacenan como colesterol libre en gránulos formados fundamentalmente por tubulina (Clark y Shay, 1981). La polimerización de la tubulina por el  $\text{Ca}^{2+}$  parece dar lugar a que el colesterol quede libre en el citoplasma y pueda ser transportado a las mitocondrias por una proteína (Kowal, 1970). Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es baja la tubulina permanece en forma granular (Temple y Wolf, 1973).

El estímulo para la secreción da lugar a una serie de cambios drásticos en la forma de las células adrenocorticales ("rounding") que consiste en la pérdida de la forma fusiforme o poligonal y en la adopción de forma esférica con retracción de las microproyecciones ("stress fibers"), proliferación en la superficie de proyecciones cortas (microvilli) y aumento del tamaño del núcleo. Estas alteraciones, que se han observado en cultivos primarios de adrenales de rata (Slavinski-Tueley

y Auersperg, 1978; Cheitlin y Ramachandran, 1981), en adrenales humanas (Neville y O'Hare, 1978; Simonian y Gill, 1981) y en células adrenocorticales Y-1 (Mattson y Kowal, 1980), se acompañan además de otras en los organelos intracelulares como son el aumento de las vesículas pinocíticas, redistribución de los lisosomas, hipertrofia del aparato de Golgi y aumento del número y volumen de las mitocondrias (Malamed, 1975).

Los niveles de  $Ca^{2+}$ , al igual que la proteincinasa dependiente de AMPc, parece mediar las alteraciones del citoesqueleto que se producen durante la estimulación por ACTH (Mattson y Kowal, 1980). Durante la estimulación de la ACTH se produce una reorganización de los microfilamentos en lugares críticos del citoplasma, lo cual se cree es un paso importante para favorecer tanto la biosíntesis como la secreción hormonal. Los cambios en el citoesqueleto favorecen la internalización del colesterol unido a la membrana, el movimiento de las vesículas pinocíticas y el acercamiento de las mitocondrias a los depósitos de colesterol (Mrotek y Hall, 1975 y 1977; Hall y col., 1979).

La procedencia del  $Ca^{2+}$  necesario tanto para el aumento de la biosíntesis como para la secreción ha sido debatida (liberación de depósitos intracelulares o entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular). En experimentos realizados en tejido adrenal "in vitro" se ha comprobado que es necesaria una mínima cantidad de  $Ca^{2+}$



en la solución externa para que la ACTH aumente la secreción (Jaanus y col., 1970, véase "Introducción"). Así mismo, se ha observado un aumento en la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  externo durante la estimulación con el secretagogo (Leier y Jungmann, 1973). Los datos electrofisiológico acerca de los cambios de conductancia producidos en la membrana de estas células son hasta el momento muy escasos. Existe una observación de que la secreción de hormonas esteroideas por estimulación con ACTH va precedida por una despolarización lenta del potencial de membrana cuya magnitud depende de la concentración del secretagogo y que en algunos casos se acompañan de potenciales de acción (Lymangrover y col., 1982). La despolarización inducida por la ACTH desaparece casi totalmente en presencia de 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Co}$ , mientras que no se afecta por la 4-aminopiridina (bloqueante de los canales de  $\text{K}^+$  de activación retardada y anómala) ni por TTX. La secreción disminuye igualmente con  $\text{Cl}_2\text{Co}$  aunque no se anula totalmente. Estos mismos autores han observado así mismo que el AMPc da lugar también a una despolarización que no se afecta por la adición de  $\text{Cl}_2\text{Co}$  y cuyo comienzo está en función de la concentración del nucleótido.

Los datos obtenidos en nuestro trabajo mediante el registro intracelular demuestran que las células Y-1 son excitables y que poseen una conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del voltaje. La importancia funcional de una conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  en estas células se deduce de los

distintos procesos, referidos más arriba, que dependen de los niveles intracelulares de este catión.

En relación con el papel funcional de la conductancia al  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$ , caracterizada mediante la técnica de "patch clamp", su importancia parece radicar en la regulación de la entrada de  $Ca^{2+}$  (Marty, 1983b; Petersen y Maruyama, 1984). La activación de esta conductancia, además de depender del potencial de membrana y de la  $[Ca^{2+}]_i$ , en algunas células se ha descrito que se afecta por factores intracelulares como la concentración de hidrogeniones (Cook y col., 1984). Así mismo existen algunas observaciones sobre la posible modulación de la misma por enzimas fosforilantes (De Feyer y col., 1982). El canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  podría ser por lo tanto un buen candidato para actuar como eslabón entre la actividad metabólica celular y el resto de las permeabilidades iónicas.

Las conductancias al  $Ca^{2+}$  y al  $K^+$  (dependiente de  $Ca^{2+}$ ) en células adrenocorticales posiblemente son los mecanismos más críticos de los que dispone estas células para regular los niveles de  $Ca^{2+}_i$ . Desde el punto de vista funcional es por lo tanto de especial interés el estudio de los factores que activan y regulan estas conductancias iónicas. En base al trabajo ya realizado y a la información disponible en la literatura, se han planteado distintas hipótesis de trabajo que son objeto de nuestra actividad experimental presente y de la que se llevará a cabo en un futuro inmediato.

Estas hipótesis se centran en los siguientes puntos:

1) Mecanismo fisiológico por el que se activan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . A este respecto planteamos dos hipótesis basadas en observaciones realizadas en otras preparaciones: a) activación mediante la despolarización producida por el cierre de canales de  $\text{K}^+$  responsables del potencial de membrana; se han descrito canales de  $\text{K}^+$  que se cierran en presencia de enzimas fosforilantes (Castelluci y col., 1980; Klein y col., 1982; Siegelbaum y col., 1982; Alkon y col., 1983; Shuster y col., 1985) o ante incrementos de los niveles citoplasmáticos de ATP (Noma, 1983; Cook y Hales, 1984); b) activación mediante la fosforilización directa de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  como parece ocurrir en las fibras musculares cardíacas (Brum y col., 1983; Reuter, 1983) y en neuronas de "Aplysia" (Kaczmarek y col., 1980). A este respecto es de señalar que en células adrenocorticales, además de la proteincinasa dependiente de AMPc, se ha aislado proteincinasa C y que cualquiera de las dos podría afectar a las conductancias iónicas de la membrana tal y como ocurre en otros tipos de células (en el esquema de la Figura 51 se ha representado con líneas de puntos los posibles mecanismos de estas hipótesis).

2) Análisis de los diferentes metabolitos o iones que regulan la actividad del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en las células adrenocorticales. Este canal, dada su gran conductancia y su distribución homogénea en estas

células, posiblemente contribuya de forma importante en la regulación de las concentraciones iónicas intracelulares, en el mantenimiento del potencial de membrana y en el equilibrio osmótico celular.

3) Identificación de otros tipos de canales iónicos ( $K^+$ ,  $Cl^-$ , etc) e interrelación de éstos con el esquema general propuesto.

## CONCLUSIONES

1) En el presente trabajo se han estudiado las características electrofisiológicas y las conductancias iónicas de células adrenocorticales en cultivo.

2) Se han montado las técnicas de registro intracelular y de "patch clamp", siendo una parte importante de este proyecto el diseño y la construcción del equipo electrónico de registro utilizado en el mismo.

3) Las células Y-1 tienen un potencial de membrana de  $-68 \pm 12,9$  mV ( $n=63$ ). En ningún caso se observó actividad eléctrica espontánea; sin embargo, en todos los registros la despolarización de la células con pulsos cuadrados de corriente positiva dió lugar a la generación de potenciales de acción.

4) Los potenciales de acción de las células adrenocorticales Y-1 tienen un umbral de excitación alto ( $42,9 \pm 17$  mV) una amplitud de 55-140 mV y una duración muy variable (6-300 ms). Estos potenciales de acción se caracterizan por tener una fase de subida lenta del orden de 18 V/s, una fase de meseta durante la cual se produce una repolarización lenta y cuya prolongación es la principal responsable del aumento de duración de los potenciales de acción, y una fase de repolarización del

orden de 41 V/s que se continúa con una pequeña hiperpolarización.

5) Los potenciales de acción registrados en células adrenocorticales no se afectan en presencia de TTX o en una solución sin  $\text{Na}^+$  y se anulan cuando se sustituye el  $\text{Ca}^{2+}$  de la solución externa por  $\text{Co}^{2+}$ , lo cual indica la existencia en estas células de una conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del voltaje.

6) La sustitución del  $\text{Ca}^{2+}$  de la solución externa por  $\text{Ba}^{2+}$  da lugar a la aparición, tras la inyección de corriente despolarizante, de potenciales de acción de  $\text{Ba}^{2+}$  que se caracterizan por tener un umbral de excitación muy bajo, una fase de despolarización muy lenta seguida de otra más rápida y de una meseta que dura tanto como el pulso de corriente inyectada. Este hecho se debe a la mayor permeabilidad de los iones de  $\text{Ba}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

7) La duración de los potenciales de acción de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta con estímulos prolongados o con pequeños incrementos en la cantidad de corriente inyectada. Este hecho se debe posiblemente a inactivación con voltajes positivos y alto  $\text{Ca}^{2+}$ , de una conductancia al  $\text{K}^+$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la cual parece participar en la repolarización de los potenciales de acción.

8) Mediante el registro de la corriente que fluye a través de canales iónicos incluidos en microáreas de membranas se han observado distintos tipos de canales de  $K^+$  en células Y-1.

9) El presente trabajo se ha centrado en la identificación y análisis de un canal de  $K^+$  de gran conductancia (aprox. 182 pS en soluciones simétricas de 130 mM  $K^+$ , n=29). Este canal se registró en el 99% de los parches de membrana aislados en el presente estudio, encontrándose generalmente de 1 a 5 canales por microárea de membrana (aprox.  $1 \mu m^2$ ).

10) La activación del canal de  $K^+$  de gran conductancia se afecta por el voltaje aplicado a ambos lados de la membrana. En microáreas aisladas "in situ" y con soluciones fisiológicas en contacto con la superficie externa de la membrana la activación del canal, para pequeñas despolarizaciones, aumenta e veces por cada 7-10 mV de incremento del potencial de membrana.

11) La activación de este canal depende también de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , pero es independiente de la concentración extracelular de este catión. El canal tiene una probabilidad de estar abierto,  $P(a)$ , de

0,5 a -40 mV de despolarización cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , es de 2-3  $\mu\text{M}$ ; esta misma probabilidad se alcanza a -70 mV con 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ .

12) El  $\text{Ca}^{2+}$ , modula la activación del canal por el potencial de membrana. El canal es muy poco dependiente del voltaje con concentraciones extremas de  $\text{Ca}^{2+}$ , (50 y 0,01  $\mu\text{M}$ ), pero presenta su máxima sensibilidad al voltaje con concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , cercanas a las fisiológicas.

13) La conductancia del canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  no se modifica con variaciones en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (2-50  $\mu\text{M}$ ). La conductancia es lineal en soluciones simétricas de  $\text{K}^+$  (130 mM) aunque a voltajes extremos ( $\pm 50$  mV) se observa una disminución de la misma.

14) El canal de  $\text{K}^+$  activado por  $\text{Ca}^{2+}$  presenta una cinética compleja. En células Y-1 posee dos subestados de conductancia que representan el 25-35% y el 55% de la corriente a través del estado normal. Ambos estados pueden aparecer en un mismo canal. Pueden observarse que las aperturas y cierres de canal se distribuyen en forma de brotes, lo que hace sugerir que el canal posee más de un estado cerrado. En ocasiones se registraron periodos de inactivación durante los cuales el canal permaneció varios segundos cerrado; la vuelta a la actividad normal se produjo espontáneamente.



15) El canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  es muy selectivo para el  $K^+$  como lo demuestra la comparación de las curvas I/V procedentes de las observaciones experimentales con las obtenidas teóricamente según la ecuación de GHK para un canal 100 veces más selectivo al  $K^+$  que al  $Na^+$ .

16) La corriente a través del canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  se afecta por los iones de  $Na^+$  presentes en las soluciones de registro. El  $Na^+$  tiene un efecto bloqueante sobre este canal cuya magnitud está en función del potencial de membrana. El  $Ca^{2+}$  parece tener un efecto similar.

17) Las células adrenocorticales son, por tanto, eléctricamente excitables y poseen conductancias al  $Ca^{2+}$  y al  $K^+$  activada por  $Ca^{2+}$ . En estas células la secreción de hormonas esteroideas por estimulación con ACTH requiere la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular en el rango de mM. Las conductancias iónicas descritas en este trabajo son las que regulan la entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula y en consecuencia desempeñan un papel importante en la regulación de la secreción.

## REFERENCIAS

- Aldrich, R.W., Corey, D.P. y Stevens, C.F. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature*, 306: 436-441, 1983
- Alkon, D.L., Acosta-Urquidi, J.D., Olds, J. Kuzma, G. y Neary, J.T. Protein kinase injection reduces voltage-dependent potassium current. *Science*, 219: 303-306, 1983
- Armstrong, C.M. Ionic pores, gates, and gating currents. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 7: 179-210, 1975
- Armstrong, C.M. y Matteson, D.R. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227: 65-67, 1985
- Armstrong, C.M., Swenson, R.F. y Taylor, S.R. Block of the squid axon K<sup>+</sup> channels by internally and externally applied Ba<sup>2+</sup> ions. *J. Gen. Physiol.*, 80: 663-682, 1982
- Ashcroft, F.M., Harrison, D.E. y Ashcroft, S.J.H. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature* 312: 446-448, 1984
- Atwater, I., Dawson, D.M., Ribalet, B. y Rojas, E. Potassium permeability activated by intracellular calcium ion concentration in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J. Physiol. (Lond.)* 288: 575-588, 1979
- Atwater, I., Ribalet, B. y Rojas, E. Cycles changes in potential and resistance of the  $\beta$ -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. *J. Physiol. (Lond.)* 278: 117-139, 1978
- Auerbach, A. y Sachs, F. Flickering of a nicotinic ion channel to a subconductance state. *Biophys. J.* 42: 1-10, 1982
- Barrett, J.N., Magleby, K.L. y Pallotta, B.S. Properties of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 331: 211-230, 1982
- Bean, P.B., Nowycky, M.D. y Tsien, R.W. Electrical estimates of Ca channel density in heart cell membranes. *Biophys. J.* 41: 295A, 1983
- Beckett, G.J. y Boyd, G.S. Purification and control of bovine adrenal cortical cholesterol ester hydrolase and evidence for the activation of the enzyme by a phosphorylation. *Eur. J. Biochem.*, 72: 223-233, 1977

- Bevan, S. Gray, P.T.A. y Ritchie, J.M. A high conductance anion-selective channel in rat Schwann cells. *J. Physiol. (Lond.)* 348: 18P, 1984
- Biales, B., Dichter, M.A. y Tischler, A. Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* 262: 743-753, 1976
- Biales, B., Dichter, M.A. y Tischler, A. Sodium and calcium action potential in pituitary cells. *Nature*, 267: 172-174, 1977
- Birmingham, M.K., Elliott, F.H. y Valere, H.L. The need for the presence of calcium for the stimulation "in vitro" of rat adrenal glands by adrenocorticotrophic hormone. *Endocrinology* 53: 687-689, 1953
- Birmingham, M.K., Kurlents, E., Lane, R., Muhlstock, B. y Traikov, H. Effects of calcium on the potassium and sodium content of rat adrenal glands, on the stimulation of steroid production by adenosine 3',5'-monophosphate, and on the response of the adrenal to short contact with ACTH. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 38: 1077-1085, 1960
- Blair, L.A.C. y Dionne, V.E. Developmental acquisition of  $Ca^{2+}$ -sensitivity by  $K^+$  channels in spinal neurones. *Nature*, 315: 329-330, 1985
- Blatz, A.L. y Magleby, K.L. Single voltage-dependent chloride-selective channels of large conductance in cultured rat muscle. *Biophys. J.* 43: 237-241, 1983
- Blatz, A.L. y Magleby, K.L. Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Gen. Physiol.*, 84: 1-23, 1984
- Bloodworth, J.M.B. y Powers, K.L. The ultrastructure of the normal dog adrenal. *J. Anat.*, 102: 457-476, 1968
- Bormann, J., Sakmann, B. y Seifert, W. Isolation of GABA-activated single-channel  $Cl^-$  currents in the soma membrane of rat hippocampal neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 341: 9-10P, 1983
- Bourque, C.W. y Renaud, L.P. Activity dependence of action potential duration in rat supraoptic neurosecretory neurones recorded "in vitro". *J. Physiol. (Lond.)* 363: 429-439, 1985
- Boyd, G.S. y Trzeciak, W.H. Cholesterol metabolism in the adrenal cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 212: 361-377, 1973
- Brandt, B.L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y. y Miyazaky, S.

Brandt, B.L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y. y Miyazaky, S. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* 263: 417-439, 1976

Brown, A.M., Camerer, H., Kunze, D.L. y Lux, H.D. Similarity of unitary  $Ca^{2+}$  currents in three different species. *Nature*, 299: 156-158, 1982

Brown, H. y DiFrancesco, D. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sino-atrial node. *J. Physiol. (Lond.)* 308: 331-351, 1980

Bruce, B.R. y Anderson, N.C., Jr. Hyperpolarization in mouse parathyroid cells by low calcium. *Am. J. Physiol.*, 263: C15-C21, 1979

Brum, G., Flockerzi, V., Hofmann, F., Osterrieder, W. y Trautwein, W. Injection of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into isolated cardiac myocytes. *Plügers Arch.*, 398: 147-154, 1983

Cachelin, A.B., De Peyer, J.E., Kokubun, S. y Reuter, H.  $Ca^{2+}$  channel modulation by 8-bromocyclic AMP in cultured heart cells. *Nature*, 304: 462-464, 1983a

Cachelin, A.B., De Peyer, J.E., Kokubun, S. y Reuter, H. Sodium channels in cultured cardiac cells. *J. Physiol. (Lond.)* 340: 389-401, 1983b

Castelluci, V.F., Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Wilson, D. F., Nairn, A.L. y Greengard, P. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioural sensitization in "Aplysia". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 7492-7496, 1980

Castillo del, J. y Katz, L. The effect of calcium ions on the motor end-plate potential. *J. Physiol. (Lond.)* 116: 507-515, 1952

Cheitlin, R. y Ramachandran, J. Regulation of actin in rat adrenocortical cells by corticotropin. *J. Biol. Chem.*, 256: 3156, 1981

Clapham, D.E. y Neher, E. Substance P reduces acetylcholine-induced currents in isolated bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* 347: 255-277, 1984a

Clapham, D.E. y Neher, E. Trifluoperazine reduces inward ionic currents and secretion by separate mechanisms in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* 353: 541-564, 1984b

Clark, M.A. y Shay, J.W. The response of whole and enucleated adrenal cortical tumor cells (Y-1 cells) to ACTH treatment. *Scanning Electron Micros.*, 3: 527, 1979

Clark, M.A. y Shay, J.W. The role of tubulin in the steroidogenic response of murine adrenal and rat Leydig cells. *Endocrinology* 109: 2261-2263, 1981

Cole, K.S. Membranes, ions and impulses: a chapter of classical biophysics. University of California Press, Berkeley, pp 569, 1968

Cook, D.L. y Hales, C.N. Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 311: 271-273, 1984

Cook, D.L., Ikeuchi, M. y Fujimoto, W.F. Lowering of  $pH_i$  inhibits  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 311: 269-271, 1984

Conti, F., De Felice, L.J. y Wanke, E. Potassium and sodium current noise in the membrane of the squid giant axon. *J. Physiol. (Lond.)* 248: 45-82, 1975

Corey, D.P. y Stevens, C.F. Science and technology of patch-recording electrodes. En: Single channel recording. B. Sakmann y E. Neher (eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 53-68, 1983

Coulombe, A. y Duclouhier, H. A large unit conductance channel permeable to chloride ions in cultured rat heart cells. *J. Physiol. (Lond.)* 350: 52P, 1984

Culty, M., Vilgrain, I. y Chambaz, E.M. Steroidogenic properties of phorbol ester and a  $Ca^{2+}$  ionophore in bovine adrenocortical cells suspensions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 121: 499-506, 1984

Chabala, L.D., Lester, H.A. y Sheridan, R.E. Single channel currents from cholinergic receptors in cultured muscle. *Soc. Neurosc. Abstr.* 8 (1): 498, 1982

Cheitlin, R. y Ramachandran, J. Regulation of actin in rat adrenocortical cells by corticotrophin. *J. Biol. Chem.*, 256: 3156, 1981

Dean, P.M. y Matthews, E.K. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature*, 219: 389-390, 1968

Dean, P.M. y Matthews, E.K. Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J. Physiol. (Lond.)* 210: 255-264, 1970

Dean, P.M., Matthews, E.K. y Sakamoto, Y. Pancreatic islet cells: effects on monosaccharides, glucoytic intermediates and metabolic inhibitors on membrane potential and electrical activity. *J. Physiol. (Lond.)* 246: 459-478, 1975

De Feyer, J.E., Cachelin, A.B., Levitan, I.B. y Reuter, H.  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  conductance in internally perfused snail neurones is enhanced by protein phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 4207-4211, 1982

Dexter, R.N., Fishman, L.M. y Ney, R.L. Stimulation of adrenal cholesterol uptake from plasma by adrenocorticotropin. *Endocrinology*, 87: 836, 1970

Douglas, W.W. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmac.*, 34: 451-474, 1968

Douglas, W.W., Kanno, T. y Sampson, S.R. Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* 191: 107-121, 1967

Douglas, W.W. y Rubin, R.P. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* 159: 40-57, 1961

Douglas, W.W. y Rubin, R.P. The mechanism of catecholamine release from the adrenal medulla and the role of calcium in stimulus-secretion coupling. *J. Physiol. (Lond.)* 167: 288-310, 1963

Fakunding, J.L., Chow, R. y Catt, K. The role of calcium in the stimulation of aldosterone production by adrenocorticotropin, angiotensin II, and potassium in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology*, 109: 2196, 1979

Farese, R.V. y Prudente, W.J. On the role of calcium in adrenocorticotropin-induced changes in mitochondrial pregnenolone synthesis. *Endocrinology*, 103: 1264-1271, 1978

Faust, J.R., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured mouse adrenal cells. *J. Biol. Chem.*, 252: 4861-4871, 1977

Fenwick, E.M., Marty, A. y Neher, E. A patch clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol. (Lond.)* 331: 557-597, 1982a

- Fenwick, E.M., Marty, A. y Neher, E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)* 331: 599-635, 1982b
- Ferguson, J.J. Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J. Biol. Chem.*, 238: 2754-2759, 1963
- Findlay, I. A patch-clamp study of potassium channels and whole cell currents in acinar cells of the mouse lacrimal gland. *J. Physiol. (Lond.)* 350: 179-195, 1984
- Frankenhaeuser, B. y Hodgkin, A.L. The action of calcium on the electrical properties of the squid axon. *J. Physiol. (Lond.)* 137: 218-244, 1957
- Funkenstein, B., McCarthy, J.L., Dus, K.M., Simpson, E.R. y Waterman, M.R. Effect of adrenocorticotropin on steroid 21-hydroxylase synthesis and activity in cultured bovine adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.*, 258: 9398-9405, 1983
- Gammel, R.T., Laychock, S.G. y Rubin, R.P. Ultrastructural and biochemical evidence for a steroid containing secretory organelle in the perfused cat adrenal gland. *J. Cell Biol.*, 72: 209-215, 1977
- Goldman, D.E. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.*, 27, 37-60, 1943
- Gorman, A.L.F. y Thomas, M.V. Potassium conductance and internal calcium accumulation in a molluscan neurone. *J. Physiol. (Lond.)* 308: 287-313, 1980
- Gorman, A.L.F., Woolum, J.C. y Cornwall, M.C. Selectivity of the  $Ca^{2+}$ -activated and light-dependent  $K^{+}$  channels for monovalent cations. *Biophys. J.*, 38: 319-322, 1982
- Gwynne, J., Hess, B., Rountree, R. y Wolf, W. Enhancement of steroidogenesis by serum lipoproteins in human, rat, and mouse adrenal cells. Program and Abstracts of the 60th Annual Meeting of The Endocrine Society, Miami, Florida, p. 221, 1978
- Hagiwara, S., Fukuda, J. y Eaton, D.C. Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp. *J. Gen. Physiol.*, 63: 564-578, 1974
- Hagiwara, S. y Ohmori, H. Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with patch electrode voltage clamp. *J. Physiol. (Lond.)* 331: 231-252, 1982
- Hagiwara, S. y Ohmori, H. Studies of single calcium channel currents in rat clonal pituitary cells. *J. Physiol. (Lond.)* 336: 649-661, 1983

- Hagiwara, S., Ozawa, S. y Sand, O. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.*, 65: 617-644, 1975
- Haksar, A. y Peron, F.G. The role of calcium in the steroidogenic response of the rat adrenal cells to adrenocorticotrophic hormone. *Biochim. Biophys. Acta* 313: 363, 1973
- Hall, P.F., Charpponnier, C., Nakamura, M. y Gabbiani, G. The role of microfilaments in the response of adrenal tumor cells to adrenocorticotrophic hormone. *J. Biol. Chem.*, 254: 9080-9084, 1979
- Hall, P.F., Nakamura, M. y Mrotek, J.J. The actions of various cytochalasins on mouse adrenal tumor cells in relation to trophic stimulation of steroidogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 676: 338, 1981a
- Hall, P.F., Osawa, S. y Thomasson, C.L. The role for calmodulin in the regulation of steroidogenesis. *J. Cell Biol.*, 90: 402-407, 1981b
- Hamill, O.P., Bormann, J., Sakmann, B. Activation of multiple conductance state chloride channels in spinal neurons by glycine and GABA. *Nature* 305: 805-808, 1983
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., y Sigworth, F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, 391: 85-100, 1981
- Hamill, O.P. y Sakmann, B. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* 294, 462-464, 1981
- Harper, J.F., Cheung, W.Y., Wallace, R.W., Huang, H., Levine, S. y Steiner, A. Localization of rat calmodulin in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 366, 1980
- Haynes, R.C., Jr. The activation of adrenal phosphorylase by the adrenocorticotropin hormone. *J. Biol. Chem.*, 233: 1220-1222, 1958
- Hechter, O. Corticosteroid release from the isolated adrenal gland. *Federation Proc.*, 8: 70-71, 1949
- Hess, P., Lansman, J.B. y Tsien, R.W. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311: 538-544, 1984
- Heuser, J.E., Reese, T.S. y Landis, D.M. Functional changes in frog neuromuscular junction studied with freeze-fracture. *J. Neurocytol.*, 3: 109-131, 1974



- Heyer, C.B. y Lux, H.D. Properties of a facilitating calcium current in pacemaker neurones of the the snail "Helix pomatia". J. Physiol. (Lond.) 262: 319-348, 1976a
- Heyer, C.B. y Lux, H.D. Control of the delayed outward potassium current in bursting pacemaker neurones of the snail "Helix pomatia". J. Physiol. (Lond.) 262: 349-382, 1976b
- Hille, B. Ionic channels in excitable membranes. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1984
- Hodking, A.L. y Huxley, A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of "Loligo". J. Physiol. (Lond.) 116: 449-472, 1952
- Hodgkin, A.L. y Horowicz, P. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibers. J. Physiol. (Lond.) 148: 127-160, 1959
- Hodgkin, A.L. y Katz, B. The The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol. (Lond.) 108: 37-77, 1949
- Horn, R. y Patlak, J. Single channel current from excised patches of muscle membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 6930-6934, 1980
- Horn, R., Patlak, J., Stevens, C.F. Sodium channels need not to open before they inactivate. Nature, 291: 426-427, 1981
- Jaanus, S.D., Rosenstein, M.J. y Rubin, R.P. On the mode of action of ACTH on the isolated perfused adrenal gland. J. Physiol. (Lond.) 209: 539-556, 1970
- Katzmarek, L.K., Jennings, K.R., Strumwasser, F., Nairn, A.C., Walter, U., Wilson, D.F. y Greengard, P. Microinjection of catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase enhances calcium action potentials of bag cell neurons in cell culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 7487-7491, 1980
- Kaczorowski, G.J., Vandlen, R.L., Katz, G.M. y Reuben, J.P. Regulation of excitation-secretion coupling by thyrotropin-releasing hormone (TRH): Evidence for TRH receptor-ion channel coupling in cultured pituitary cells. J. Membrane Biol., 71: 109-118, 1983
- Katz, B. y Miledi, R. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. J. Physiol. (Lond.) 189: 534-544, 1967

Kitabchi, A.E. y Sharma, R.K. Corticosteroidogenesis in isolated adrenal cells of rats. I. Effects of corticotropins and 3',5'-cyclic nucleotides on corticosterone production. *Endocrinology*, 88: 1109-1116, 1971

Kidokoro, Y. Spontaneous calcium action potentials in the clonal pituitary cell line and their relationship to prolactin secretion. *Nature*, 258, 741-742, 1975

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

Klein, M, Camardo, J. y Kandel, E.R. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in "Aplysia". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 5713-5717, 1982

Kohlhardt, M., Bauer, M., Krause, H. y Fleckenstein, A. Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors. *Pflügers Arch.*, 335: 309-322, 1972

Koletsky, R.J., Brown, E.M. y Williams, G.H. Calmodulin-like activity and calcium-dependent phosphodiesterase in purified cells of the zona glomerulosa and zona fasciculata. *Endocrinology*, 113: 485-490, 1983

Koritz, S.B. y Feron, F.G. The stimulation in "vitro" by  $Ca^{2+}$ , freezing, and proteolysis of corticoid production by rat adrenal tissue. *J. Biol. Chem.*, 234: 3122-3125, 1959

Kostyuk, P.G., Krishtal, O.A., Shakhovalov, Y.A. Separation of sodium and calcium currents in the somatic membrane of mollusc neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 270: 545-568, 1977

Kovanen, P.T., Faust, J.R., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. I. Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells. *Endocrinology*, 104:599-609, 1979

Kovanen, P.T., Basu, S.K., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. II. Low density lipoprotein binding to membranes prepared from fresh tissue. *Endocrinology*, 104: 610-616, 1979

Kowal, J. Adrenal cells in tissue culture. VII: effects of inhibitors of protein synthesis on steroidogenesis and glycolysis. *Endocrinology*, 87: 951, 1970

Kramer, R.E., Anderson, C.M., Peterson, J.A., Simpson, E.R. y Waterman, M.R. Adrenotoxin biosynthesis by bovine adrenal cells in monolayer culture. *J. Biol. Chem.*, 257: 14921-14925, 1982

Kramer, R.E., Simpson, E.R. y Waterman, M.R. Induction of  $11\beta$ -hydroxylase by corticotropin in primary cultures of bovine adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.*, 258: 3000-3005, 1983

Labarca, P.P. y Miller, C. A  $K^+$  selective, three state channel from fragmented sarcoplasmic reticulum of frog leg muscle. *J. Membrane Biol.*, 61: 31-38, 1981

Latorre, R. y Miller, C. Conduction and selectivity in potassium channels. *J. Membr. Biol.*, 71: 11-30, 1983

Latorre, R., Vergara, C. e Hidalgo, C. Reconstitution in planar lipid bilayers of a  $Ca^{2+}$ -dependent  $K^+$  channel from transverse tubule membrane isolated from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 804-809, 1982

Latorre, R., Vergara, C. y Moczdlowski, E. Properties of a  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in a reconstituted system. *Cell Calcium*, 4: 343-357, 1983

Laüger, P. Diffusion-limited ion flow through pores. *Biochim. Biophys. Acta*, 455: 493-509, 1976

Leier, D.J. y Jungmann, R.A. Adrenocorticotropic hormone and dibutyryl adenosine cyclic monophosphate-mediated  $Ca^{2+}$  uptake by rat adrenal glands. *Biochim. Biophys. Acta*, 329: 196-210, 1973

López Barneo, J. y Armstrong, C.M. Depolarizing response of parathyroid cells to divalent cations. *J. Gen. Physiol.*, 82: 269-294, 1983

López Barneo, J. y Armstrong, C.M. Loss of potassium channel activity in the absence of external calcium ions. *Biological Bulletin*, 1985 (en prensa)

López Barneo, J. y Llinás, R. Electrophysiology of mammalian tectal neurons "in vitro": possible use-dependent increase in calcium conductance (en preparación)

López Barneo, J., Tabares, L. y Castellano, A. Potassium channels in adrenocortical and parathyroid cells. En: *Biophysics of the pancreatic beta cell*, I. Atwater, E. Rojas y B. Soria (eds.) Plenum Press, Nueva York, 1985 (en prensa)

- Lundberg, A. The electrophysiology of the submaxillary gland of the cat. *Acta physiol. scand.*, 35: 1-25, 1955
- Luse, S. Fine structure of the adrenal cortex. En: *The adrenal cortex*. A.B. Eisenstein (ed.). Boston, pp. 1-59, 1967
- Lux, H.D. y Nagy, K. Single channel  $Ca^{2+}$  currents in "Helix pomatia" neurons. *Pflügers Arch.*, 391: 252-254, 1981
- Lux, H.D., Neher, E. y Marty, A. Single channel activity associated with the calcium-dependent outward current in "Helix pomatia". *Pflügers Arch.*, 389: 293-295, 1981
- Lymangrover, J.R., Matthews, E.K. y Saffran, M. Membrane potential changes of mouse adrenal zona fasciculata cells in response to adrenocorticotropin and adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology*, 110: 462-468, 1982
- LLinás, R. y Steinberg, I.Z. y Walton, K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophys. J.*, 33: 323-352, 1981
- LLinás, R. y Yarom, Y. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurons "in vitro". Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.*, 315: 549-567, 1981
- Magleby, K.L. y Pallotta, B.S. Burst kinetics of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 344: 607-623, 1983a
- Magleby, K.L. y Pallotta, B.S. Calcium dependence of open and shut interval distributions from calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 344: 585-604, 1983b
- Magleby, K.L. y Stevens, C.F. A quantitative description of end-plate currents. *J. Physiol. (Lond.)* 223: 173-197, 1972
- Malamed, S. Ultrastructure of the mammalian adrenal cortex in relation to secretory function. En: *Handbook of Physiology sección 7, volumen VI*. American Physiological Society, Washinton D.C., pp.25-39, 1975
- Marty, A. Ca-dependent potassium channel with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*, 291: 497-500, 1981
- Marty, A. Blocking of large unitary calcium-dependent potassium currents by internal sodium ions. *Pflügers Arch.*, 396: 179-181, 1983a

Marty, A.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels with large unitary conductance. *TINS*, 6: 262-265, 1983b

Marty, A., Tan, Y.P. y Trautmann, A. Three types of calcium-dependent channel in rat lacrimal glands. *J. Physiol. (Lond.)* 357: 293-325, 1984

Maruyama, Y. y Petersen, O.H. Cholecystokinin activation of single-channel currents is mediated by internal messenger in pancreatic acinar cells. *Nature* 300: 61-63, 1982

Maruyama, Y., Gallacher, D.V. y Petersen, O.H. Voltage and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in baso-lateral acinar cell membranes of mammalian salivary glands. *Nature*, 302: 827-829, 1983a

Maruyama, Y., Petersen, O.H., Flanagan, P. y Pearson, G.T. Quantification of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels under hormonal control in pig pancreas acinar cells. *Nature*, 305: 228-232, 1983b

Matteson, D.R. y Armstrong, C.M. Na and Ca channels in a transformed line of anterior pituitary cells. *J. Gen. Physiol.*, 83: 371-394, 1984

Matthews, E.K. y Petersen, O.H. Pancreatic acinar cells: ionic dependence of the membrane potential and acetylcholine-induced depolarization. *J. Physiol. (Lond.)* 231: 283-295, 1973

Matthews, E.K. y Saffran, M. Steroid production and membrane potential measurement in cells of the adrenal cortex. *J. Physiol. (Lond.)* 198: 149-161, 1967

Matthews, E.K. y Saffran, M. Effect of ACTH on the electrical properties of adrenocortical cells. *Nature*, 219: 1369-1370, 1968

Matthews, E.K. y Saffran, M. Ionic dependence of adrenal steroidogenesis and ACTH-induced changes in the membrane potential of adrenocortical cells. *J. Physiol. (Lond.)* 234, 43-64, 1973

Matthews, E.K. y Sakamoto, Y. Electrical characteristics of pancreatic islet cells. *J. Physiol. (Lond.)* 246: 421-437, 1975a

Matthews, E.K. y Sakamoto, Y. Pancreatic islet cells: electrogenic and electrodiffusional control of membrane potential. *J. Physiol. (Lond.)* 246: 439-457, 1975b

Mattson, P. y Kowal, J. Acute stimulation of cultured steroidogenic adrenocortical tumor cells: an electron microscopic analysis. *Tissue Cell*, 12: 685, 1980

Mattson, P. y Kowal, J. Effects of cytochalasin B on unstimulated and adrenocorticotropin-stimulated adrenocortical tumor cells "in vitro". *Endocrinology*, 111: 1632-1647, 1982

McLaughlin, S.G.A., Szabo, G. y Eisenman, G. Divalent ions and surface potential of charged phospholipid membranes. *J. Gen. Physiol.*, 58: 667-687, 1971

Meissner, H.P. Electrical characteristics of the beta-cells in pancreatic islets. *J. Physiol. (Paris)* 72: 757-767, 1976

Meissner, H.P. y Schmelz, H. Membrane potential of beta-cells in pancreatic islets. *Pflügers Arch.* 351: 195-206, 1974

Methfessel, C. y Boheim, C. The gating of single calcium-activated potassium channels is described by an activation-blockade mechanism. *Biophys. Struct. Mech.*, 5: 35-60, 1982

Moczydlowski, E. y Latorre, R. Gating kinetics of  $Ca^{2+}$  activated  $K^{+}$  channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence for two voltage-dependent  $Ca^{2+}$  binding reactions. *J. Gen. Physiol.*, 82: 511-542, 1983

Morrissey, J.J. y Klahr, S. Dissociation of membrane potential and hormone secretion in bovine parathyroid cells. *Am. J. Physiol.*, 245: E102-E105, 1983

Mrotek, J.J. y Hall, P.F. The influence of cytochalasin B on the response of adrenal tumor cells to ACTH and cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 64: 891-896, 1975

Mrotek, J.J. y Hall, P.F. Response of adrenal tumor cells to adrenocorticotropin: site of inhibition by cytochalasin B. *Biochemistry*, 16: 3177-3181, 1977

Nambi, P., Nambi, V.A., Roberts, A.N. y Sharma, R.K. Relationship of calcium and membrane guanylate cyclase in adrenocorticotropin-induced steroidogenesis. *Endocrinology*, 111: 196-200, 1982

Nambi, P. y Sharma, R.K. Adrenocorticotropic hormone-responsive guanylate cyclase in the particulate fraction of rat adrenal glands. *Endocrinology*, 108: 2025-2027, 1981

- Narahashi, T. Chemicals as tools in the study of excitable membranes. *Physiol. Rev.*, 54: 813-889, 1974
- Natke, E., Jr. y Kabela, E. Electrical responses in the cat adrenal cortex: possible relation to aldosterone secretion. *Am. J. Physiol.*, 237: E158-E162, 1979
- Neher, E. y Sakmann, B. Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature*, 260: 799-802, 1976
- Neher, E., Sakmann, B. y Steinbach, J.H. The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes. *Pflügers Arch.*, 375: 219-228, 1978
- Neville, A.M. y O'Hare, M.J. Cell culture and histopathology of the human adrenal cortex in relation to hypercorticalism. En: *The endocrine function of the human adrenal cortex*. V.H.T. James, M. Serio, G. Giusti y L. Martini (eds.) Academic Press, Londres, p 229, 1978
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Taadaki, H., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. y Numa, S. Primary structure of "Electrophorus electricus" sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature*, 312: 121-127, 1984
- Noma, A. ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle. *Nature*, 305: 147-148, 1983
- Nussdorfer, G.G., Mazzocchi, G., Neri, G. y Robba, C. Investigations into the mechanism of hormone release by rat adrenocortical cells. *Cell and Tissue Res.*, 189: 403-408, 1977
- Ohashi, M., Simpson, E.R., Mason, J.I. y Waterman, M.R. Biosynthesis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 in human fetal adrenal cells in culture. *Endocrinology*, 112: 2039-2045, 1983
- Okamoto, H., Takahashi, K. y Yoshii, M. Two components of the calcium current in the egg cell membrane of the tunicate. *J. Physiol. (Lond.)* 255: 527-561, 1976
- Ozawa, S. y Kimura, N. Calcium channel and prolactin release in rat clonal pituitary cells: effects of verapamil. *Am. J. Physiol.*, 243: E68-E73, 1982
- Pallotta, B.S., Magleby, K.L. y Barrett, J.N. Single channel recording of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  currents in rat muscle cell culture. *Nature*, 293: 471-474, 1981

Pearse, R.B., Cronshaw, J. y Holmes, W.N. The fine structure of the inter-renal cells of the duck ("Anas platyrhynchos") with evidence for the possible exocytotic release of steroids. *Cell and Tissue Res.*, 183: 203-220, 1977

Peron, F.G. y McCarthy, J.L. Corticosteroidogenesis in the rat adrenal gland. En: *Functions of the adrenal cortex*, vol. 1. K.W. McKerns (ed.) Appleton-Century-Croft, Nueva York, 1968

Petersen, O.H. The electrophysiology of gland cells. *Monographs of the Physiological Society*, nº 36, Academic Press, Londres, 1980

Petersen, O.H. y Maruyama, Y. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature*, 307: 693-696, 1984

Reuter, H. Calcium channel modulation by neurotransmitter, enzymes, and drugs. *Nature*, 301: 569-574, 1983

Reuter, H., Stevens, C.F., Tsien, R., y Yellen, G. Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature*, 297: 501-504, 1982

Rubin, R.P. Calcium and the secretory processes. Plenum Press, Nueva York, 1974

Sabatini, D.D. y De Robertis, E.D.P. Ultrastructural zonation of adrenocortex in the rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 105-120, 1961

Saffran, M., Grad, B. y Bayliss, M.J. Production of corticoids by rat adrenals "in vitro". *Endocrinology*, 50: 639-643, 1952

Sakmann, B. y Neher, E. Single channel recording. Plenum Press, Nueva York, 1983

Sayers, G., Beal, R.J. y Seelig, S. Isolated adrenal cells: adrenocorticotrophic hormone, calcium, steroidogenesis and cyclic adenosine monophosphate. *Science*, 175: 1131, 1972

Schimmer, P.B. The adrenocortical tumor cell line, Y-1. En: *Functionally differentiated cell lines*. G. Sato (ed.) Liss, Nueva York, p 61, 1981



Sekimoto, T., Tanaka, Y., Imagawa, N., Tomita, C. y Matsuba, M. Possible involvement of  $Ca^{2+}$ -calmodulin system in cyclic AMP action in cholesterol ester hydrolytic response to ACTH in bovine adrenocortical cells. *Endocrinol. Japon*, 31: 283-289, 1984

Shima, S., Kawashima, Y. y Hiray, M. Studies on cyclic nucleotides in the adrenal gland. VIII. Effects of angiotensin on adenosine 3',5'-monophosphate and steroidogenesis in the adrenal cortex. *Endocrinology*, 103: 1361-1367, 1978

Shuster, M.J., Camardo, J.S., Siegelbaum, S.A. y Kandel, E.R. Cyclic AMP-dependent protein kinase closes the serotonin-sensitive  $K^+$  channels of "Aplysia" sensory neurones in cell-free membrane patches. *Nature*, 313: 292-295, 1985

Sibley, C.P., Whitehouse, B.J., Vinson, G.P. y Goddard, C. Studies on the mechanism of secretion of rat adrenal steroids "in vitro". *J. Steroids Biochemistry*, 13: 1231-1239, 1980

Sibley, C.P., Whitehouse, B.J., Vinson, G.P., Goddard, C. y McCredie, E. Studies on the mechanism of secretion of corticosteroids by the isolated perfused adrenal of the rat. *J. Endocr.*, 91: 313-323, 1981

Siegelbaum, S.A., Camardo, J.S. y Kandel, E.R. Serotonin and cAMP close single K channels in "Aplysia" sensory neurons. *Nature*, 299: 413-417, 1982

Sigworth, F.J. Electronic design of the patch clamp. En: Single channel recording. B. Sakmann y E. Neher (eds). Plenum Press, Nueva York, pp 3-35, 1983

Sigworth, F.J. y Neher, E. Single  $Na^+$  channel currents observed in cultured rat muscle cells. *Nature* 287: 447-449, 1980

Simonian, M.H. y Gill, G.N. Regulation of the fetal human adrenal cortex: effects of adrenocorticotropin on growth and function of monolayer cultures of fetal and definitive zone cells. *Endocrinology*, 108: 1769, 1981

Simpson, E.R. y Williams-Smith, D.L. Effect of calcium (ion) uptake by rat adrenal mitochondria on pregnenolone formation and spectral properties of cytochrome P-450. *Biochim. Biophys. Acta* 329: 196, 1973

Simpson, L.L. The role of calcium in neurohumoral and neurohormonal extrusion processes. *J. Pharm. Pharmac.*, 20: 889-910, 1968

Slavinski-Tueley, E.A. y Auersperg, N. Cultured adrenocortical cells in various states of differentiation: electron microscopic characterization and ultrastructural response to adrenocorticotrophin. *J. Endocr.*, 78: 427-434, 1978

Swann, H.G. The pituitary-adrenocortical relationship. *Physiol. Rev.*, 20: 493-521, 1940

Tabares, L. y López Barneo, J. Calcium and potassium conductances in adrenocortical cells. *Neurosc. Lett.*, 22: S576, 1985

Tabares, L., López Barneo, J. y De Miguel, M. Calcium- and voltage-activated potassium channels in adrenocortical cell membranes. *Bioch. Biophys. Acta*, 814: 96-102, 1985

Tank, K.D.W. y Miller, C. y Webs, W.W. Isolated-patch recording from liposomes containing functionally reconstituted chloride channels from "Torpedo electroplax". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 7749-7753, 1982

Taraskevich, P.S. y Douglas, W.W. Action potentials occur in cells of the normal anterior pituitary gland and are stimulated by the hypophysiotropic peptide thyrotropin-releasing hormone. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 4064-4067, 1977

Taraskevich, P.S. y Douglas, W.W. Electrical behavior in a line of anterior pituitary cells (GH cells) and the influence of the hypothalamic peptide, thyrotropin releasing factor. *Neuroscience*. 5: 421-431, 1980

Temple, R. y Wolf, J. Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents. *J. Biol. Chem.*, 248: 2691, 1973

Trautmann, A. y Marty, A. Activation of Ca-dependent K channels by carbamylcholine in rat lagrimal glands. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 611-615, 1984

Tsien, R.W. Calcium channels in excitable cell membrane. *Ann. Rev. Physiol.*, 45, 341-358, 1983

Vergara, C. y Latorre, R. Kinetics of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels from rabbit muscle incorporated into planar bilayers. Evidence for a Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> blockade. *J. Gen. Physiol.*, 82: 543-568, 1983

Vogt, M. The output of cortical hormone by the mammalian suprarenal. *J. Physiol. (Lond.)* 102: 341-356, 1943

Wallace, J., Pintado, E. y Scarpa, A. Parathyroid hormone secretion in the absence of extracellular free  $Ca^{2+}$  and transmembrane  $Ca^{2+}$  influx. FEBS Letters, 151: 83-88, 1983

Wong, B.S., Lecar, H. y Adler, M. Single calcium-dependent potassium channels in clonal anterior pituitary cells. Biophys. J., 39: 313-317, 1982

Yanagibashi, K. Calcium ions as "second messenger" in corticoidogenic action of ACTH. Endocrinol. Japon., 26: 227-232, 1979

Yasumura, Y. Retention of differentiated function in clonal animal cell lines, particularly hormone secreting cultures. Am. Zool., 8: 285, 1966

Yasumura, Y., Bounassisi, V. y Sato, G. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. Cancer Res., 26: 529-535, 1966

Yellen, G. Ionic permeation and blockade in  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels of bovine chromaffin cells. J. Gen. Physiol., 84: 157-186, 1984