

P/138

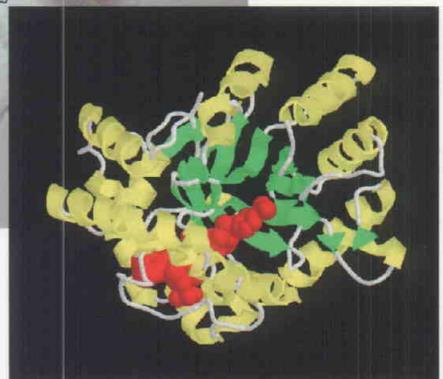
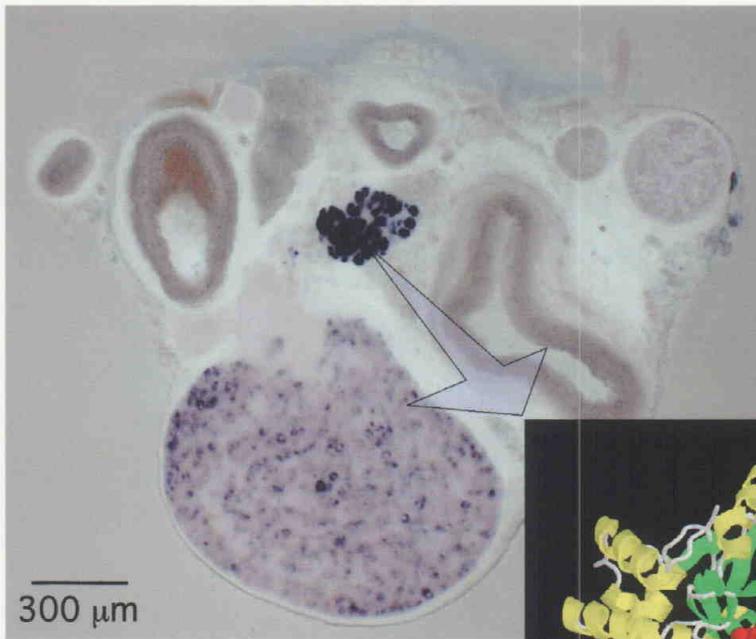


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica

**Sensibilidad a hipoxia e hipoglucemia de
células glómicas en rodajas de cuerpo carotídeo**



TESIS DOCTORAL
Ricardo Pardal Redondo
Sevilla, 2000

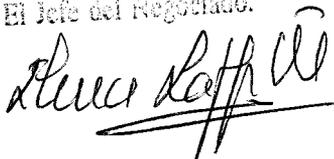
Sensibilidad a hipoxia e hipoglucemia de células glómicas en rodajas de cuerpo carotídeo

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS
Queda registrado el trabajo de Doctor al
folio 247 número 249 del libro
correspondiente.
03 AGO. 2000
Sevilla,

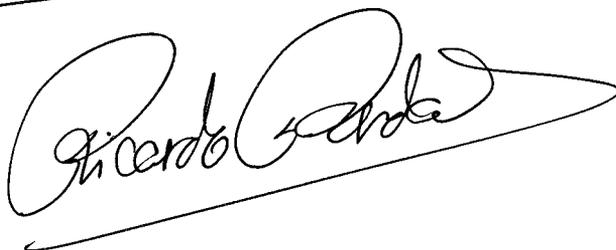
40

7/138

El Jefe del Negociado.



Ricardo Pardal Redondo



Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Biología
por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2000

Ilustración en portada: Corte transversal de la bifurcación de la arteria carótida a la altura del cuerpo carotídeo, y tinción específica de las células glómicas. Detalle: Modelo de hélices α y láminas β (y unión a NADPH, en rojo) obtenido a partir de la cristalografía de la subunidad β de canales de potasio tipo Kv (modificado de Gulbis y cols., 1999).



D. José López Barneo, Catedrático en el área de Fisiología y adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA:

Que D. Ricardo Pardal Redondo ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "**Sensibilidad a hipoxia e hipoglucemia de células glómicas en rodajas de cuerpo carotídeo**" que presenta para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 24 de Julio de 2000.



DPTO. DE FISIOLÓGIA MÉDICA
Y BIOFÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA

José López Barneo

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. El cuerpo carotídeo como quimiorreceptor arterial	1
2. Morfología y estructura del cuerpo carotídeo	3
3. Las células tipo I como sensores de oxígeno	5
4. Naturaleza del sensor de oxígeno	10
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Preparaciones celulares	17
1.1. Cultivo de rodajas finas de cuerpo carotídeo	17
1.2. Técnicas histológicas	21
2. Registro de las corrientes iónicas mediante la técnica de <i>patch-clamp</i>	24

2.1. Dispositivo electrónico	24
2.2. Equipamiento	25
2.3. Fabricación de las micropipetas de registro	26
2.4. Proceder experimental	27
2.5. Configuración de registro <i>whole-cell</i> y cálculo de los parámetros eléctricos de la membrana celular	29
3. Registro de la actividad secretora celular mediante amperometría	32
3.1. Dispositivo electrónico de amplificación y registro	32
3.2. Señal amperométrica y eventos únicos de secreción ...	34
3.3. Fabricación de los electrodos de fibra de carbono	35
3.4. Proceder experimental	37
RESULTADOS	39
1. Características generales de las células del cuerpo carotídeo en rodajas	39
1.1. Propiedades electrofisiológicas	39
1.2. Actividad secretora	45
2. Respuesta a hipoxia de las células glómicas en rodajas	48
2.1. Corrientes iónicas sensibles a la pO_2	48
2.2. Estimulación de la actividad secretora	49
2.3. Dependencia de la respuesta quimiorreceptora de calcio extracelular	51
3. Efecto del bloqueo farmacológico de canales de potasio en las células glómicas	52
3.1. Efecto del TEA sobre las corrientes de potasio	53
3.2. Efecto del TEA sobre la actividad secretora celular ...	54
3.3. Efecto del TEA sobre células insensibles a hipoxia	56
3.4. Potenciación del efecto de la hipoxia por TEA	57
3.5. Efecto de la iberiotoxina	58

4. Papel de la mitocondria en el proceso quimiotransductor del cuerpo carotídeo	59
4.1. Efecto del cianuro sódico	59
4.2. Efecto de los protonóforos	61
4.3. Efecto de la rotenona	62
4.4. Efecto de la antimicina A	65
4.5. Efecto del doble estímulo, rotenona y antimicina A . . .	67
4.6. Efecto de la rotenona sobre las corrientes de potasio . .	68
5. Estudio del efecto de la hipoglucemia sobre el cuerpo carotídeo	70
5.1. Efecto de la ausencia de glucosa sobre la secreción celular en rodajas finas de cuerpo carotídeo	71
5.2. El efecto de la hipoglucemia es dosis-dependiente . . .	73
5.3. Relación entre el efecto activador de la hipoglucemia y la metabolización de la glucosa	75
5.4. Interacción de la hipoxia con la hipoglucemia	76
5.5. Efecto de la hipoglucemia sobre las corrientes de potasio	78
DISCUSIÓN	82
1. La preparación de rodajas finas de cuerpo carotídeo	82
2. Participación de los canales de potasio voltaje-dependientes en el mecanismo de quimiotransducción	84
3. Bloqueantes mitocondriales y mecanismo sensor de oxígeno . .	85
4. El cuerpo carotídeo como glucosensor	92
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	99

INTRODUCCIÓN

1. El cuerpo carotídeo como quimiorreceptor arterial

El cuerpo carotídeo es un pequeño órgano ovoide localizado bilateralmente en la bifurcación de la arteria carótida (Fig. 1A) y constituye el quimiorreceptor arterial más importante en los mamíferos, siendo su función principal la detección de la tensión de oxígeno (pO_2) de la sangre. El cuerpo carotídeo está conectado al centro respiratorio sobre el que actúa para provocar las respuestas ventilatorias adecuadas en diferentes condiciones fisiológicas y ambientales. El conocimiento actual acerca de la estructura y la fisiología del cuerpo carotídeo se sustenta sobre los trabajos pioneros de De Castro y Heymans (De Castro, 1926; Heymans y cols., 1930). De hecho, fue el español Fernando de Castro quien, basándose en un minucioso estudio morfológico, propuso la naturaleza quimiorreceptora del órgano. Aunque el estímulo principal del cuerpo carotídeo es un descenso en la pO_2 arterial, éste también responde a otras variables fisicoquímicas de la sangre tales como la pCO_2 , el pH, la temperatura, el

flujo y la presión arteriales o la osmolaridad (Heymans y cols., 1930; Bernthal y Weeks, 1939; Landgren y Neil, 1951; Hornbein y cols., 1961; Hornbein y Roos, 1963; Gallego y Belmonte, 1979; para revisiones más recientes ver Fidone y González, 1986; Fitzgerald y Lahiri, 1986).

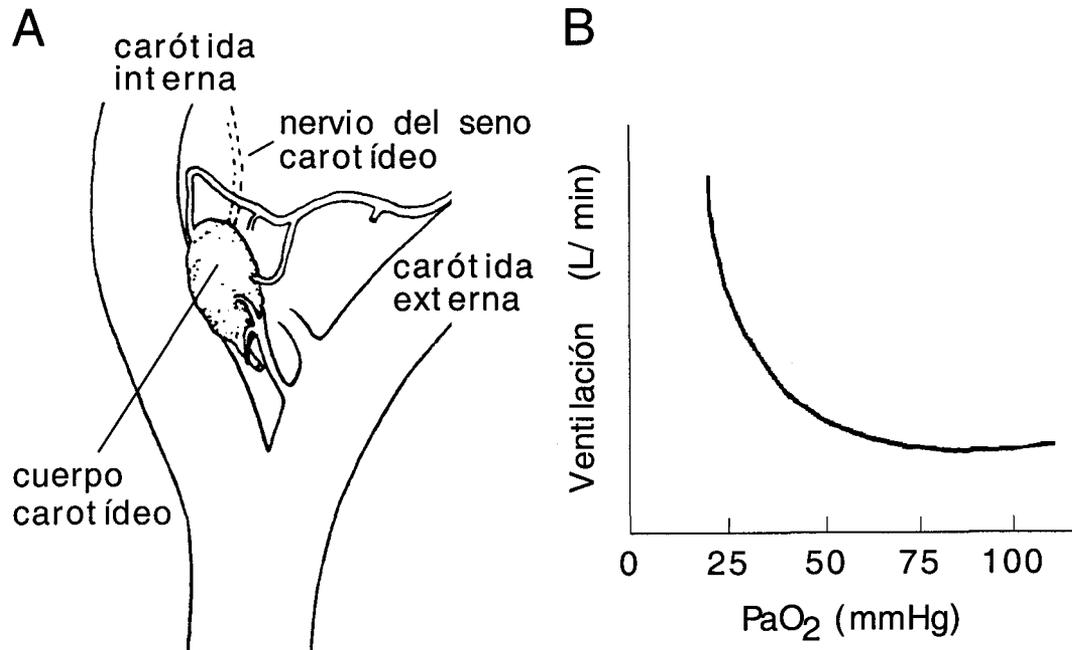


Figura 1. A. Localización del cuerpo carotídeo en la bifurcación de la arteria carótida principal. B. Tasa ventilatoria en un perro anestesiado en función de la presión arterial de oxígeno (modificado de Fitzgerald y Lahiri, 1986).

La respuesta hiperventilatoria a la hipoxia sistémica se ilustra en la figura 1B. La actividad ventilatoria se relaciona con la pO_2 mediante una curva hipérbolica típica que es similar a la que se observa cuando se mide la frecuencia de impulsos aferentes en el nervio del seno carotídeo (ver más adelante) en función de los cambios de pO_2 (Biscoe y cols., 1970). De hecho, el reflejo hiperventilatorio a la hipoxemia desaparece o se deprime de forma muy marcada al seccionar el nervio glossofaríngeo (Fitzgerald y Lahiri, 1986).

Debido a la participación del cuerpo carotídeo en el mantenimiento de las constantes del medio interno, algunos autores han propuesto que este órgano podría estar también implicado en la regulación de la glucemia, variable que junto a la pO_2 es crítica para la viabilidad de las

neuronas del sistema nervioso central (SNC). La estimulación del cuerpo carotídeo parece provocar una hiperglucemia refleja y una mayor retención de glucosa en el cerebro (Álvarez-Buylla y de Álvarez-Buylla, 1988; Álvarez-Buylla y cols., 1997). El mecanismo propuesto para esta acción hiperglucemiante es la activación de la secreción de catecolaminas en la médula adrenal, lo que a su vez aumentaría la glucogenolisis. Dado que los procesos celulares que podrían estar implicados en la detección por el cuerpo carotídeo de los cambios plasmáticos de glucosa se desconocen, su estudio ha sido uno de los objetivos fundamentales del presente trabajo (ver "Objetivos").

2. Morfología y estructura del cuerpo carotídeo

El cuerpo carotídeo de rata posee un diámetro medio de unos 0.4 mm y un peso de menos de 1 mg, aunque, naturalmente, estas características varían entre las distintas especies. El cuerpo carotídeo es el órgano más vascularizado del organismo y está ricamente innervado por fibras sensoriales aferentes y por fibras del sistema nervioso autónomo. La innervación principal es a través del nervio del seno carotídeo, rama del nervio glosofaríngeo (IX par craneal), que contiene fibras que proceden fundamentalmente de neuronas sensoriales primarias localizadas en el ganglio petroso. Además de la innervación sensorial, el cuerpo carotídeo recibe innervación eferente parasimpática y simpática, esta última a través de pequeños nervios ganglio-glomerulares procedentes del ganglio cervical superior que se encuentra muy próximo (Fidone y González, 1986).

A comienzos de siglo se empezó a estudiar la estructura interna del cuerpo carotídeo (Gómez, 1908). En estos trabajos se hace ya una distinción clara, atendiendo a la morfología, entre células tipo I y células tipo II como células mayoritarias del órgano. El estudio morfológico detallado llevado a cabo por De Castro mostró que las células en el cuerpo carotídeo se disponen formando glomérulos (De Castro, 1926). Estos glomérulos

constan de células esféricas de unas 10 a 12 μm de diámetro, ricas en vesículas claras y sobre todo en vesículas de centro denso y diámetro entre 70 y 180 nm (Fig. 2B). Estas células, llamadas células glómicas o tipo I, tienen el aspecto típico de células neurosecretoras, y recuerdan en morfología, aunque más pequeñas, a las células cromafines de la médula adrenal. Rodeando a las células glómicas se encuentran otras células menores y con forma alargada llamadas células sustentaculares o tipo II (Fig. 2B). Estas últimas no poseen vesículas en su interior y recuerdan en morfología a las células de la glia del sistema nervioso periférico, de la glia vascular y de la glia envolvente. Las células tipo I y tipo II del cuerpo carotídeo son de origen ectodérmico, es decir, derivan de la cresta neural. Si se tiñen específicamente las células tipo I presentes en un corte transversal de la bifurcación carotídea (Fig. 2A) se observa la localización del cuerpo carotídeo y su estructuración en glomérulos (cada una de las pequeñas manchas oscuras mostradas en el panel A de la figura 2). Un cuerpo carotídeo sano de rata tiene aproximadamente unas 5000 a 8000 células distribuidas en unos 100 glomérulos, con 20 a 100 células tipo I y la cuarta parte de células tipo II en cada uno de ellos (Fidone y González, 1986).

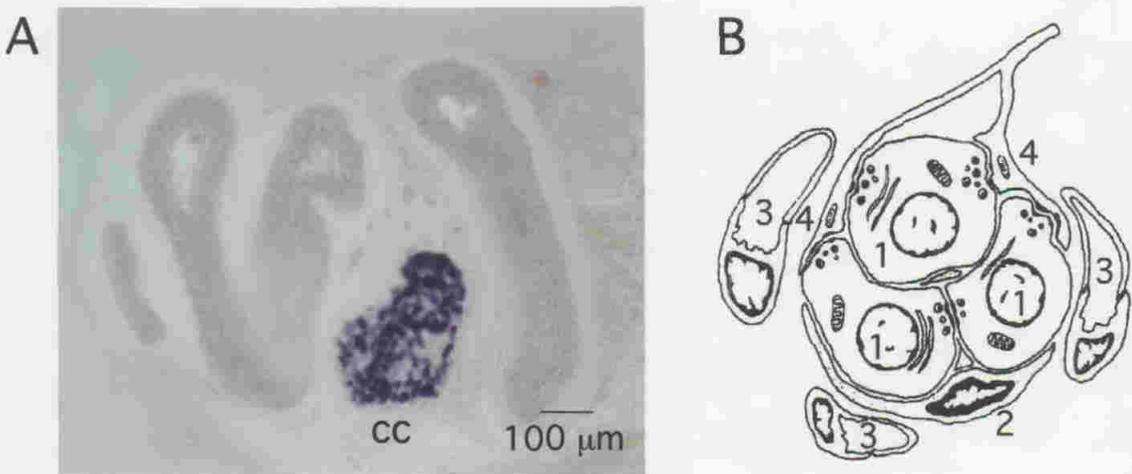


Figura 2. A. Fotografía al microscopio óptico de un corte transversal de la bifurcación carotídea a la altura del cuerpo carotídeo (cc) y tinción específica de las células tipo I. B. Esquema de un glomérulo del cuerpo carotídeo mostrando la disposición de las células tipo I (1), las células tipo II (2), los capilares sanguíneos (3) y los terminales nerviosos (4).

Además de estos dos tipos celulares principales, en el cuerpo carotídeo se encuentran células endoteliales y miocitos vasculares formando parte de los numerosos capilares sanguíneos. Por último, existe también cierto número, aunque pequeño, de neuronas simpáticas y parasimpáticas cuyos somas se disponen interglomerularmente y cuyos axones suelen estar inervando a capilares y arteriolas (Fidone y González, 1986). Por lo tanto el glomérulo típico del cuerpo carotídeo, que constituye la unidad funcional del órgano, está formado por células tipo I, células tipo II, capilares intraglomerulares y terminales de las aferencias nerviosas (Fig. 2B).

3. Las células tipo I como sensores de oxígeno

El estudio de la fisiología celular del cuerpo carotídeo y de la naturaleza quimiorreceptora de las células tipo I ha experimentado un desarrollo especial en la última década debido a la aplicación de técnicas electrofisiológicas, como el *patch-clamp*, y microfluorimétricas al estudio del órgano. La hipótesis más aceptada actualmente es que la sinapsis glómico-neural funciona como un receptor sensorial secundario, en el que un elemento sensor de las variables biológicas (la célula glómica) se antepone al elemento aferente del sistema nervioso (el terminal nervioso). La hipótesis se basa en una serie de evidencias experimentales que se resumen a continuación.

Un hallazgo que fue clave para comprender los mecanismos de la quimiotransducción fue el observar que las células tipo I del cuerpo carotídeo de conejo son excitables, es decir, tienen conductancias voltaje-dependientes en sus membranas y, por lo tanto, son capaces de generar potenciales de acción (Fig. 3A; Duchon y cols., 1988; López-Barneo y cols., 1988). Además, de entre los canales iónicos dependientes de voltaje, se descubrió un canal de potasio modulado por cambios en la tensión de oxígeno (López-Barneo y cols., 1988; Delpiano y Hescheler, 1989; Peers,

1990; Stea y Nurse, 1991). El descenso en la pO_2 de la solución externa que baña a las células glómicas genera una disminución de la probabilidad de apertura del canal sensible a O_2 , estudiado tanto en corrientes macroscópicas como en corrientes unitarias (Fig. 3B; Ganfornina y López-Barneo, 1992). Esta inhibición de la corriente de potasio tiene un efecto rápido en la frecuencia de potenciales de acción, produciendo un aumento en la pendiente del potencial marcapasos y por tanto un acortamiento del intervalo entre potenciales de acción (Fig. 3C; López-López y cols., 1989; Montoro y cols., 1996). En el animal completo, el descenso en la pO_2 produce en el nervio del seno carotídeo un aumento similar en la frecuencia de potenciales de acción que viajan hacia el sistema nervioso central (Biscoe y cols., 1970; Pepper y cols., 1995).

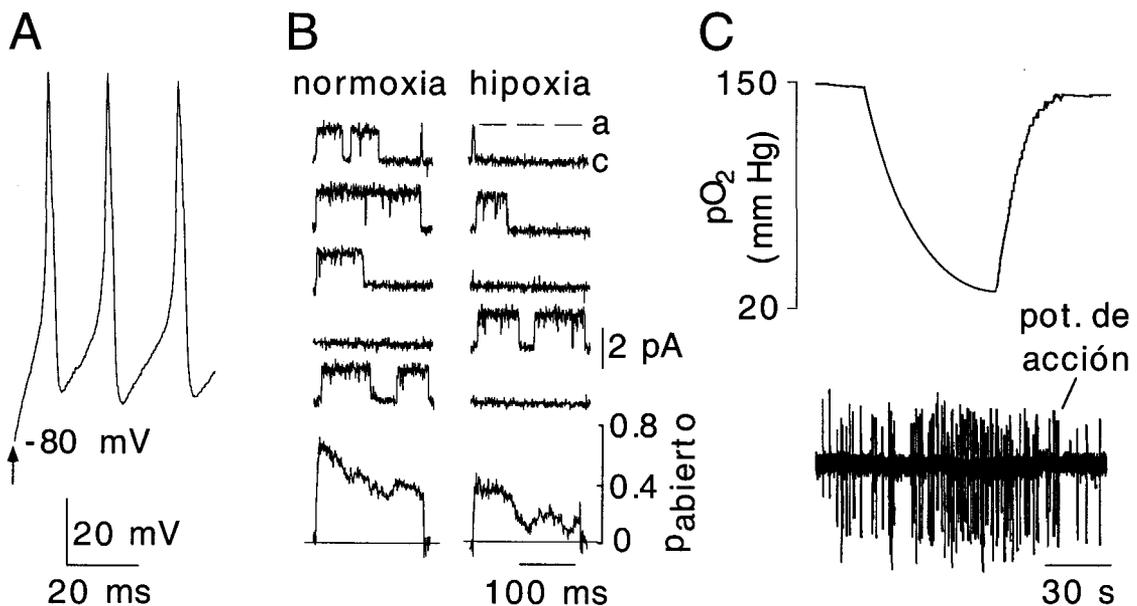


Figura 3. A. Monitorización del potencial de membrana de una célula glómica de conejo mediante la técnica de *patch-clamp* en su configuración *whole-cell*. Flecha: cambio desde el modo fijación de voltaje al modo fijación de corriente (modificado de Ureña y cols., 1989). B. Registros de canal único en un parche escindido de una célula glómica de conejo, en condiciones normóxicas ($pO_2 \approx 160$ mmHg) e hipóxicas ($pO_2 \approx 20$ mmHg), y probabilidad de apertura resultante en ambas condiciones (modificado de Ganfornina y López-Barneo, 1992). C. Monitorización de la pO_2 y registro simultáneo de corrientes de acción en una célula tipo I de conejo utilizando la técnica de *patch-clamp* en su configuración *cell-attached* (modificado de Montoro y cols., 1996).

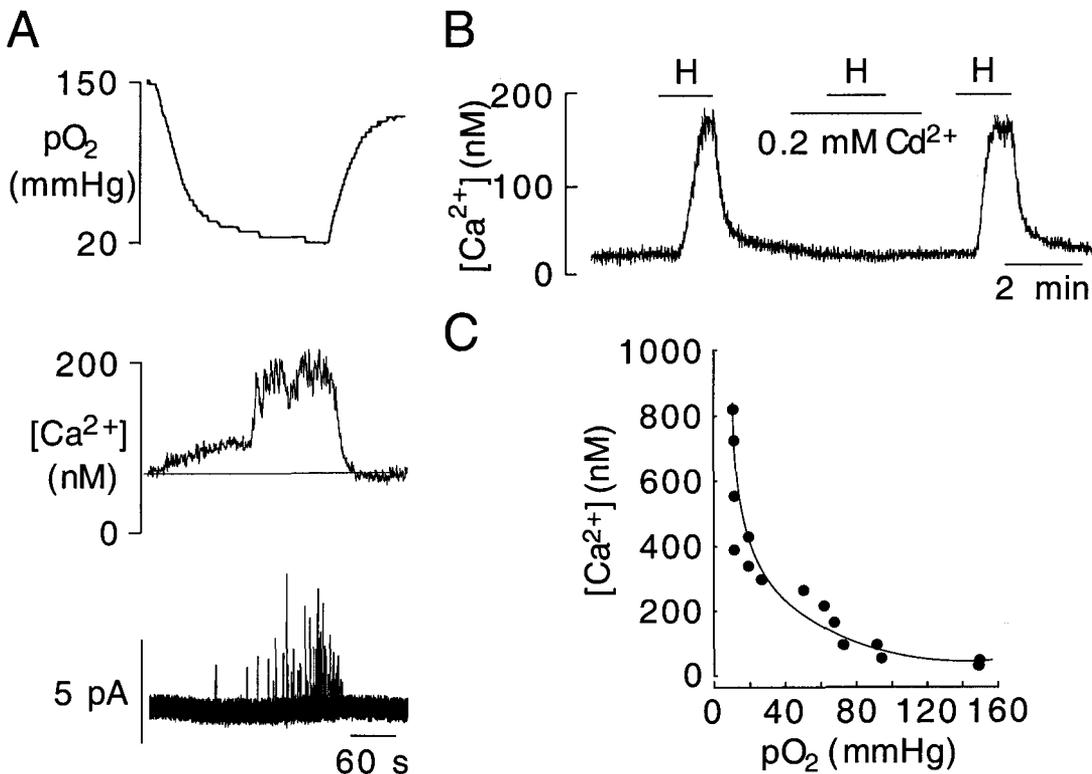


Figura 4. A. Monitorización simultánea de la pO_2 , el nivel de calcio intracelular mediante técnicas fluorimétricas con fura-2, y la secreción de vesículas de catecolaminas mediante técnicas amperométricas (modificado de Montoro y cols., 1996). B. Monitorización del nivel de calcio intracelular mediante el uso de fura-2, en respuesta a pulsos de hipoxia (H) en presencia o no de 0.2 mM cadmio, un potente inhibidor de los canales de calcio dependientes de voltaje (modificado de Ureña y cols., 1994). C. Relación entre la concentración de calcio intracelular medida con técnicas fluorimétricas y la pO_2 , en una célula glómica de conejo (modificado de Montoro y cols., 1996).

El acoplamiento funcional entre la célula glómica y el terminal nervioso es un proceso dependiente de calcio. El aumento en la frecuencia de potenciales de acción en la célula glómica induce una elevación de la concentración citoplasmática de calcio (Fig. 4A). Los iones calcio actúan como detonantes del proceso de exocitosis, dando lugar a la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico (Fig. 4A; Buckler y Vaughan-Jones, 1994; Ureña y cols., 1994; Carpenter y cols., 2000). Los transmisores más abundantes liberados por las células glómicas son dopamina, ATP y acetilcolina. Mientras que la dopamina posiblemente produce un efecto autocrino y paracrino, regulando los canales de Ca^{2+} y la secreción cuando las células están activas (Zapata, 1975; Docherty y McQueen, 1978; Benot y

López-Barneo, 1990; Bairam y cols., 2000), recientemente se ha demostrado que el ATP, y en menor importancia, la acetilcolina, son los transmisores que activan las fibras nerviosas aferentes que transmiten la información quimiosensorial al sistema nervioso central (Zhang y cols., 2000).

Como se ilustra en la figura 4B, el calcio necesario para activar la exocitosis entra en la célula desde el exterior a través de canales de calcio voltaje-dependientes. El incremento de calcio inducido por la hipoxia no ocurre al bloquear los canales de calcio con cadmio. En la figura 4C se muestra la relación entre la concentración citoplasmática de calcio y la pO_2 en la solución externa. Esta relación hiperbólica es muy similar a la que describe el reflejo hiperventilatorio a la hipoxemia en el animal anestesiado (ver Fig. 1B), lo que indica claramente el papel fundamental de las células glómicas como elementos sensores de oxígeno en el cuerpo carotídeo. La dependencia de calcio extracelular de la respuesta secretora de las células glómicas a la hipoxia muestra de forma inequívoca la importancia de los fenómenos eléctricos de la membrana en el proceso quimiotransductor.

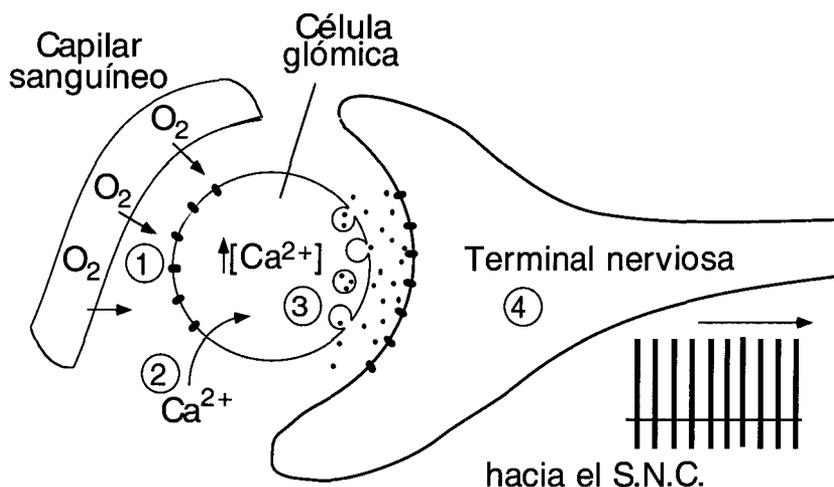


Figura 5. Esquema ilustrativo del mecanismo de quimiotransducción en un glomérulo del cuerpo carotídeo. Para explicación ver texto.

El mecanismo celular de quimiotransducción, basado en los hallazgos resumidos en párrafos anteriores y aceptado por la mayoría de los autores se presenta de forma esquemática en la figura 5. La detección de

la pO_2 por la célula glómica se lleva a cabo por la inhibición de canales de K^+ de la membrana, lo que determina que la célula si está silente se despolarice y si está eléctricamente activa incrementa la frecuencia de disparo de potenciales de acción (fase 1 en la figura 5). La despolarización de la membrana induce la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes y en consecuencia se produce la entrada de calcio desde el medio extracelular (fase 2). Este hecho incrementa la concentración citosólica de calcio, lo que induce la secreción de vesículas con neurotransmisores al espacio sináptico (fase 3) y la activación de las fibras nerviosas aferentes que transmiten la información al SNC codificada en frecuencia de potenciales de acción (fase 4; para revisiones sobre la fisiología celular del cuerpo carotídeo ver Biscoe y Duchon, 1990; López-Barneo y cols., 1993; González y cols., 1994; Peers y Buckler, 1995).

El modelo de quimiotransducción anteriormente expuesto y mayoritariamente estudiado en el conejo se ha corroborado en otras especies también muy utilizadas como el gato o la rata. Algunas de estas especies presentan pequeñas variaciones electrofisiológicas del modelo, como por ejemplo el tipo de canal implicado en la despolarización por hipoxia. En las células tipo I de rata es un canal de potasio voltaje- y calcio-dependiente de gran conductancia ($maxi K_{Ca}$) que se inhibe reversiblemente por la hipoxia (Peers, 1990). Otra diferencia importante es que las células tipo I del cuerpo carotídeo de rata no parecen tener actividad espontánea en forma de potenciales de acción (Stea y Nurse, 1991; Peers y Buckler, 1995). La expresión de canales de sodio dependientes de voltaje en estas células es mínima, tan solo un 10% de ellas poseen corrientes de entrada considerables (López-López y cols., 1997). Esta circunstancia llevó a algunos autores a cuestionar la participación del canal de potasio dependiente de voltaje en el inicio de la despolarización en células eléctricamente silentes (Buckler, 1997). En este último trabajo se muestra la ausencia de despolarización en células glómicas dispersas tras la

aplicación de bloqueantes de canales de potasio voltaje-dependientes como el tetraetilamonio (TEA) o la caribdotoxina (CTX). Además se describe un canal de potasio tipo *leak* sensible al oxígeno, insensible a los bloqueantes y abierto en reposo (Buckler, 1997). Se propone por último la inhibición por hipoxia de este canal como paso obligatorio en las células tipo I de rata en el proceso de quimiotransducción.

Una controversia más general en cuanto a la participación de los fenómenos eléctricos de la membrana en la quimiotransducción ha surgido de autores que utilizan como modelo de estudio preparaciones de cuerpo carotídeo completo. Se ha descrito que en estas preparaciones la perfusión del cuerpo carotídeo con solución externa que contiene bloqueantes de canales de potasio voltaje-dependientes no origina un aumento en la frecuencia de descarga del nervio del seno carotídeo como hace la hipoxia (Doyle y Donnelly, 1994; Donnelly, 1995; Osanai y cols., 1997; Lahiri y cols., 1998).

De las discrepancias en la literatura con nuestro modelo general de quimiotransducción surgió la necesidad de comprobar la validez de dicho modelo en una preparación de células glómicas que, manteniendo la integridad histológica, permitiese la accesibilidad inmediata a las células de ligandos y bloqueantes y evitase el daño general producido por la dispersión enzimática del tejido. Como se indica más adelante, dentro de los objetivos iniciales de nuestro proyecto estuvo el poner a punto dicha preparación y el comparar la respuesta secretora de las células glómicas a la hipoxia con la producida por los bloqueantes de canales de potasio sensibles al oxígeno.

4. Naturaleza del sensor de oxígeno

Desde que se describió el primer canal de potasio sensible a oxígeno en el cuerpo carotídeo de conejo (López-Barneo y cols., 1988) se han descrito otros canales iónicos (no sólo de potasio sino también de sodio y

calcio) cuya actividad se regula por los cambios de la pO_2 (para una revisión ver López-Barneo, 1996; López-Barneo y cols., 1998). En células neurosecretoras con actividad quimiorreceptora, como las de los cuerpos neuroepiteliales del pulmón, las cromafines de la médula adrenal o las clonales PC12, que responden de forma aguda a la hipoxia se han identificado canales de potasio que, como los del cuerpo carotídeo, se inhiben por la disminución de la pO_2 (Youngson y cols., 1993; Zhu y cols., 1996; Thompson y cols., 1997). También existen canales de potasio inhibidos por la disminución de la pO_2 en las células musculares lisas de las ramas finas de la arteria pulmonar, donde participan en la respuesta vasoconstrictora a la hipoxia (Post y cols., 1992; Yuan y cols., 1993).

Aunque la sensibilidad de los canales iónicos a la hipoxia parece ser un fenómeno más general de lo que se creyó inicialmente (ver López-Barneo, 1994), los mecanismos moleculares subyacentes se desconocen. Es muy probable que existan moléculas sensoras capaces de combinarse reversiblemente con el O_2 y como consecuencia de su unión o no al O_2 actúen directa o indirectamente sobre canales iónicos específicos. En el esquema de la figura 6 se muestran dos de las hipótesis más aceptadas acerca del mecanismo de acoplamiento entre el canal iónico y la molécula sensora de oxígeno. En el panel A se indica la posibilidad de que el sensor de O_2 forme parte de la estructura supramolecular oligomérica del canal, uniéndose no a la subunidad principal formadora del poro, sino a una subunidad asociada (como por ejemplo la subunidad β de los canales de potasio). El sensor en su conformación "desoxi" modificaría alostéricamente la estructura de los canales inhibiendo su probabilidad de apertura. Aunque en varias preparaciones se ha descrito que la regulación de los canales de potasio por O_2 se mantiene en parches de membrana escindidos (Ganfornina y López-Barneo, 1991; Jiang y Haddad, 1994) no se puede afirmar con certeza que esta hipótesis sea correcta ya que se sabe que los parches escindidos arrastran consigo componentes citoplasmáticos, e

incluso orgánulos completos, unidos a la cara interna de la membrana (Rustenbeck y cols., 1999), y en éstos podría encontrarse el sensor.

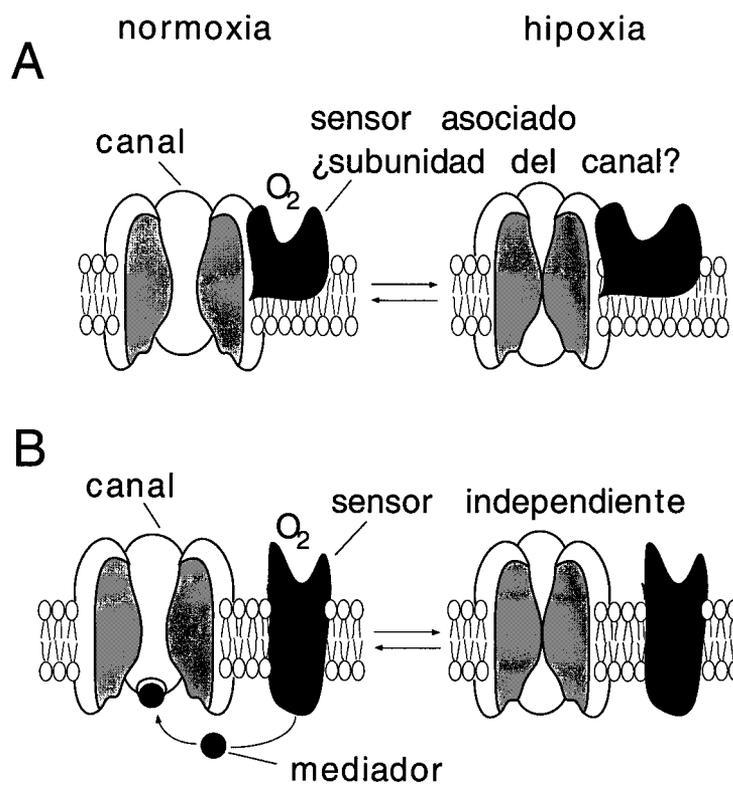


Figura 6. Esquema ilustrativo de dos hipótesis acerca de la naturaleza del sensor de oxígeno.

La otra hipótesis planteada en la figura (panel B) propone que el sensor de O_2 sea una molécula independiente de los canales, que mediante la producción de intermediarios regule el funcionamiento de éstos. El sensor podría estar asociado a la membrana (como se indica en la figura) o encontrarse en el citosol o incluso en algún orgánulo cercano a los canales iónicos. Se ha sugerido que una NADPH-oxidasa, capaz de producir radical superóxido en proporción con la tensión de O_2 podría actuar como elemento sensor en algunas células quimiorreceptoras (Acker y cols., 1989). En los cuerpos neuroepiteliales pulmonares este mecanismo parece ser posible, ya que los ratones con *knock-out* de algún componente de la NADPH-oxidasa muestran alteraciones en la regulación de la corriente de potasio por hipoxia (Wang y cols., 1996; O'Kelly y cols., 2000). Sin embargo,

es poco probable que éste sea un mecanismo general ya que en los mismos ratones con *knock-out* de la NADPH-oxidasa las respuestas a la hipoxia de otros tejidos (como el árbol arterial pulmonar e incluso el cuerpo carotídeo) se mantienen intactas (Archer y cols., 1999). La idea más generalizada es que no existe un único sensor de O_2 sino diferentes mecanismos de detección de los cambios de pO_2 que pueden actuar en paralelo en diferentes células y tejidos (ver Bunn y Poyton, 1996; López-Barneo y cols., 1998).

Dentro del campo de la fisiología del cuerpo carotídeo se propuso hace años que la mitocondria (y específicamente la citocromo c oxidasa de la cadena de transporte de electrones) podría ser el elemento sensor de O_2 (Mills y Jöbsis, 1972; Biscoe y Duchon, 1989). Las observaciones experimentales que más favorecían esta idea derivaban de estudios con microelectrodos sugiriendo que las células glómicas eran no excitables y del efecto estimulador sobre la actividad quimiosensorial de sustancias, como el cianuro (CN), que inhiben el transporte de electrones (ver Fidone y González, 1986; Biscoe y Duchon, 1990). Según la hipótesis mitocondrial o metabólica la falta de oxígeno o la aplicación de CN (estímulos que se han considerado equivalentes y que se denominan respectivamente hipoxia hipóxica e hipoxia histotóxica) inhibiría a la oxidasa, lo que daría lugar, entre otras alteraciones, a interrupción de la producción de ATP y al colapso del potencial de membrana mitocondrial. Todos estos efectos tendrían como resultado una liberación de iones calcio desde el interior mitocondrial hacia el citoplasma, activándose el proceso de secreción de vesículas con neurotransmisor. El descubrimiento de la excitabilidad de las células glómicas y de los canales regulados por el O_2 , y la demostración de la procedencia extracelular del calcio necesario para la respuesta secretora a la hipoxia (ver Figs. 3-5) son netamente opuestos a la hipótesis mitocondrial. Además, se sabe que el cuerpo carotídeo responde a niveles de pO_2 que no afectan al funcionamiento de la cadena de transporte de

electrones. Sin embargo, y dado que la naturaleza del elemento sensor de oxígeno permanece oscura, es posible que alguna proteína mitocondrial actúe como sensor de la hipoxia o que especies reactivas de oxígeno, producidas de forma dependiente de la pO_2 en varios sitios de la mitocondria, actúen como intermediarios que regulen el estado redox de los canales iónicos (Archer y cols., 1993; López-Barneo, 1996; Chandel y cols., 1997; Wang y cols., 1997). En estas circunstancias, la regulación de la actividad eléctrica y secretora celular por la hipoxia dependería de algunos aspectos del funcionamiento mitocondrial aunque éstos no implicasen necesariamente alteración de la síntesis de ATP. Dadas estas premisas, uno de los objetivos de nuestro trabajo ha sido el estudiar el papel de bloqueantes mitocondriales que actúan selectivamente a diferentes niveles de la cadena de transporte electrónico sobre el proceso quimiotransductor en células glómicas en rodajas. Nuestro interés fundamental ha sido el estudiar las relaciones que existen entre hipoxia e inhibición metabólica y analizar si la disminución de la pO_2 y la intoxicación mitocondrial son estímulos equivalentes.

OBJETIVOS

Los objetivos generales del presente trabajo fueron los siguientes:

1. Puesta a punto de la preparación de rodajas finas de cuerpo carotídeo. Nos pareció importante el desarrollo de esta nueva técnica porque, al igual que ocurre con las rodajas finas de tejido cerebral, esta preparación permitiría el estudio de la actividad secretora y de las características electrofisiológicas en células individuales identificadas en las rodajas bajo control visual. Por otra parte, la preparación evitaría el trauma que supone para las células el tratamiento enzimático y la dispersión mecánica.

2. Caracterización electrofisiológica general de las células glómicas en las rodajas y comparación de sus propiedades (tipos de corrientes, actividad secretora, sensibilidad a hipoxia, etc) con las descritas en células dispersas enzimáticamente.

3. Estudio del efecto de bloqueantes de canales de potasio sobre la actividad secretora de las células glómicas en las rodajas. Con este análisis se pretendió demostrar si, como predice el modelo de la membrana descrito en "Introducción", la inhibición de la actividad de los canales de potasio voltaje-dependientes participa de forma determinante en el mecanismo de quimiotransducción de la hipoxia en el cuerpo carotídeo de rata.

4. Análisis sistemático del efecto del bloqueo mitocondrial a diferentes niveles sobre la actividad secretora de células glómicas intactas y relaciones entre la sensibilidad a la hipoxia y la intoxicación mitocondrial. Se pretendió explorar si algún componente de la cadena de transporte de electrones podría actuar como sensor de O_2 y si la hipoxia debida a la disminución de la pO_2 es equivalente a la estimulación celular resultante de la intoxicación metabólica.

5. Estudio del posible papel glucosensor del cuerpo carotídeo, analizando la sensibilidad de las células glómicas a la hipoglucemia y el posible mecanismo de la detección de glucosa. Nos planteamos este objetivo dado el importante papel como quimiorreceptor arterial del cuerpo carotídeo y la extremada sensibilidad de las neuronas centrales a la isquemia (hipoxia mas hipoglucemia). Se postuló, por tanto, que el cuerpo carotídeo podría participar en la regulación de la glucemia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparaciones celulares

1. 1. Cultivo de rodajas finas de cuerpo carotídeo

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratas de 5 a 20 días de vida y de ambos sexos. En animales de esta edad es más sencilla la disección del cuerpo carotídeo debido a que poseen menor cantidad de tejido conjuntivo y grasa. Sin embargo es edad suficiente para que haya concluido la maduración postnatal de las respuestas a hipoxia del cuerpo carotídeo. Varios autores han descrito que la capacidad quimiotransdutora del cuerpo carotídeo está muy atenuada en los primeros días de vida, y que su sensibilidad a hipoxia no es aún la máxima. A partir de los días postnatales 8 a 10 los mecanismos de quimiorrecepción están completamente maduros, y por lo tanto el cuerpo carotídeo es capaz de procesar con eficacia las variaciones en la pO_2

sanguínea (Eden y Hanson, 1987; Kholwadwala y Donnelly, 1992; Hatton y cols., 1997; Wasicko y cols., 1999).

Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Euta-Lender, España), a una dosis aproximada de 0.2 mg/kg. Una vez fijada la rata en decúbito supino se limpió y desinfectó la zona del cuello. Se practicó una incisión longitudinal y se desgarró la musculatura junto a la tráquea. Posteriormente se procedió a retirar completa la bifurcación de la arteria carótida, la cual se introdujo rápidamente en solución 0 Ca^{2+} fría y saturada con 100% O_2 . Esta solución, utilizada en toda la disección y corte de los cuerpos carotídeos, es una modificación de la solución Tyrode con la siguiente composición en mM: 148 NaCl, 2 KCl, 3 MgCl_2 , 10 Hepes y 10 glucosa. El pH se ajustó a 7.4 con NaOH, y previamente a su uso y durante la disección la solución se saturó mediante burbujeo con 100% O_2 .

Para la disección del cuerpo carotídeo la bifurcación se fijó al fondo de una placa de Petri con Sylgard (Dow Corning Corporation, EE. UU.) y se mantuvo siempre cubierta por solución 0 Ca^{2+} fría. Se retiró el ganglio simpático situado en la parte superior de la bifurcación y posteriormente el cuerpo carotídeo, que se separó del resto de tejido para limpiarlo de grasa y tejido conjuntivo. Una vez limpio se introdujo en otro recipiente con solución 0 Ca^{2+} fría y saturada de O_2 .

Una vez obtenidos todos los cuerpos carotídeos (generalmente de 4 a 6) se incluyeron en agarosa de bajo punto de fusión (FMC Bioproducts, EE.UU.) al 3% (peso/volumen) en agua. La agarosa, contenida en pequeños recipientes hechos con fragmentos de una jeringa de insulina, no superaba los 45°C al ser incluidos los cuerpos carotídeos. De esta forma evitamos el posible daño que la alta temperatura podría ocasionar en el tejido glómico. Los recipientes se colocaron rápidamente en hielo para que la agarosa se enfriase lo antes posible.

Para proceder al corte de los cuerpos carotídeos se sacaron los bloques solidificados de agarosa de sus recipientes y se pegaron con cianoacrilato al fondo de la cámara de un vibratomo. La preparación se cubrió rápidamente con solución 0 Ca^{2+} fría y se colocó hielo alrededor de la cámara para mantener la baja temperatura. Las rodajas se cortaron de un espesor de 150 μm , obteniéndose unas 3 ó 4 por cada cuerpo carotídeo. Tras el corte éstas se colocaron en un recipiente enfriado con hielo.

Una vez obtenidas todas las rodajas (generalmente de 10 a 25) se pasaron a una placa de Petri de 35 mm donde se lavaron hasta 3 veces con PBS estéril y frío. Posteriormente se les añadió medio de cultivo DMEM (Gibco BRL, EE.UU.) suplementado con 1% (vol./vol.) de Penicilina-Estreptomicina (Gibco BRL) y 10% (vol./vol.) de suero bovino fetal (Bio-Whittaker, Bélgica). La placa se introdujo en un incubador a 37°C, con 5% de CO_2 y saturación de humedad durante 48 a 72 horas previamente al uso de las rodajas para el registro electrofisiológico. Este tiempo de incubación es el que se observó necesario para que el tejido glómico se recuperase del trauma producido por la disección y el corte. En la figura 7 se muestran fotografías de dos rodajas distintas, una recién cortada (panel A), y otra después de 48 horas en cultivo (panel B). Se observa el aspecto recuperado del tejido en la rodaja cultivada, con la aparición de acúmulos de células glómicas que sobresalen del resto. Estos agregados celulares se asemejan mucho a los glomérulos de células tipo I del cuerpo carotídeo descritos en los trabajos histológicos clásicos (Gómez, 1908; De Castro, 1926). Uno de estos acúmulos se muestra a mayor aumento en la figura 8. La flecha indica una célula algo más aislada que sería apropiada para los experimentos electrofisiológicos.

En general las rodajas se mantuvieron en cultivo entre dos y cuatro días tras su obtención. Aunque dentro del presente trabajo no se consideró la realización de cultivos organotípicos de larga duración, de ser necesario no parece que esta preparación presente problemas insalvables.

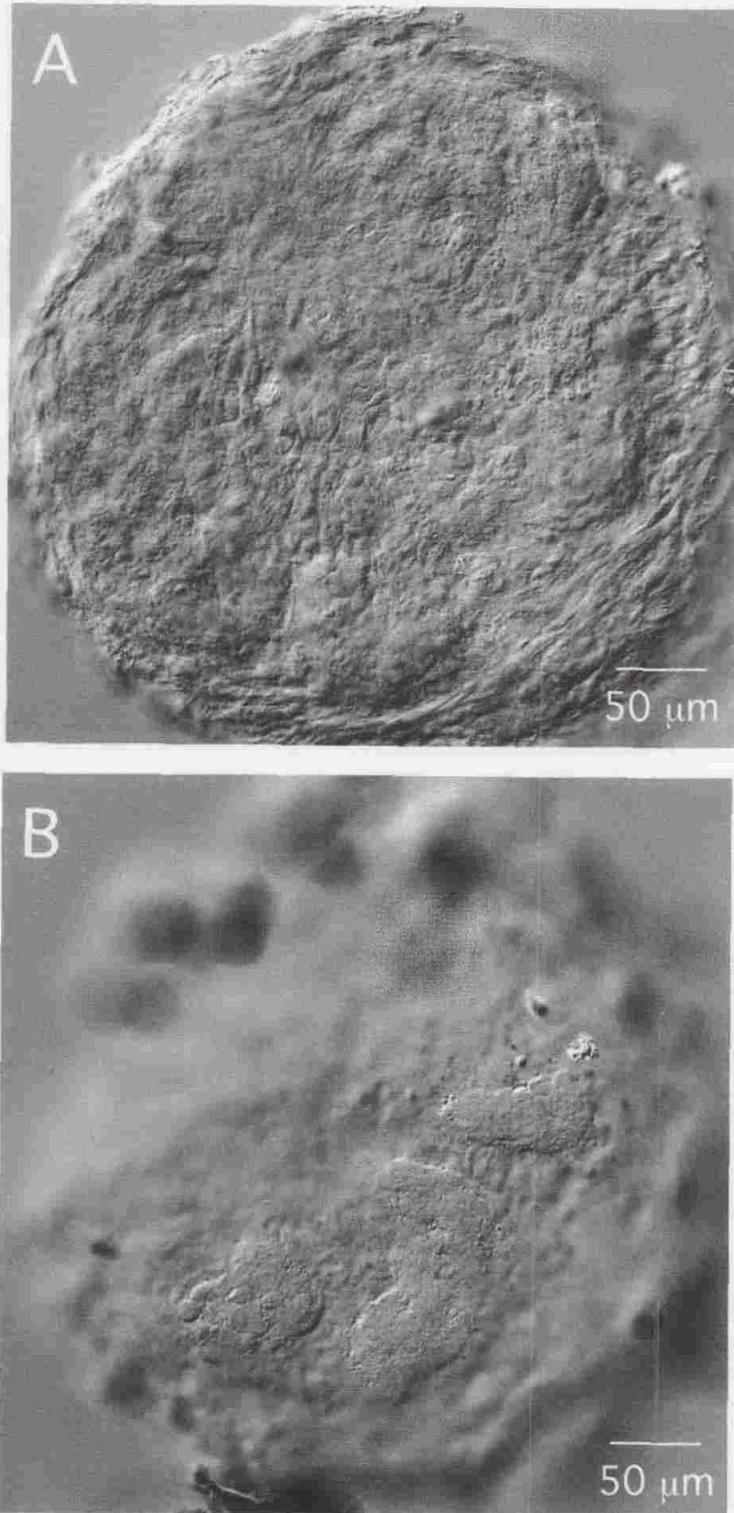


Figura 7. Fotografías en campo claro de dos rodajas de cuerpo carotídeo fijadas durante 12 horas en paraformaldehído (PFD) al 4% (vol./vol.) en PBS y montadas en portas con cubres. A. Rodaja fijada tras el corte. B. Rodaja fijada tras 48 horas en el incubador.

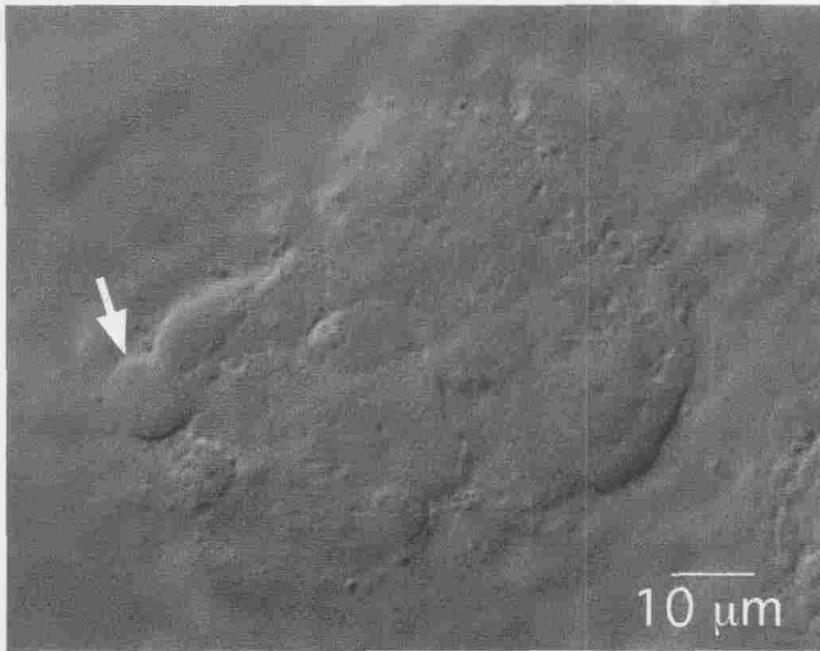


Figura 8. Fotografía en campo claro y a mayor aumento de uno de los glomérulos que se observan en la rodaja cultivada de la figura 7. La flecha indica una célula aislada y fácilmente identificable, apropiada para los experimentos electrofisiológicos.

1. 2. Técnicas histológicas

Para identificar la presencia de células glómicas en las rodajas se utilizó un protocolo de inmunohistoquímica con anticuerpos frente a Tirosina Hidroxilasa (TH). Esta enzima cataliza el paso limitante en la ruta de síntesis de la dopamina. La TH constituye por tanto un buen marcador para la detección de células dopaminérgicas como las células tipo I del cuerpo carotídeo. El protocolo de inmunohistoquímica utilizado se detalla a continuación:

- Fijación de las rodajas de cuerpo carotídeo, una vez cultivadas, durante toda la noche a 4°C en PBS + paraformaldehído al 4% (peso/vol.).

- Lavado doble con PBS + 0.1% (vol./vol.) Tritón X-100 (PBTx 0.1%).

Los lavados fueron siempre de cinco minutos en el agitador orbital.

- Deshidratación con cantidades crecientes de metanol en PBTx 0.1%, es decir, cinco minutos en 25, 50, 75 y 100% metanol.

- Rehidratación con cinco minutos en cada una de las mismas soluciones pero en el orden inverso, es decir, 100, 75, 50 y 25% metanol en PBTx 0.1%.

- Doble lavado con PBTx 0.1% y permeabilización durante 15 minutos con PBTx 0.3% en el agitador orbital.

- De nuevo lavado doble de 5 minutos cada uno con PBS, y tratamiento con agua oxigenada 0.3% en PBS durante 2 horas y a 4°C en el agitador orbital.

- Lavado con PBTx 0.1% y bloqueo de sitios inespecíficos con PBTx 0.1% + 10% FCS (suero fetal de ternera) + 1 mg/ml de BSA (albúmina bovina). Se mantuvieron en esta solución bloqueante de 2 a 6 horas a 4°C en el agitador orbital.

- Incubación con el anticuerpo primario anti-TH policlonal (1:1000, Chemicon, EEUU) en solución bloqueante, de 12 a 16 horas a 4°C y en el agitador orbital.

- Lavados durante 8 horas, cada hora, en PBTx 0.1% en el agitador orbital, y posteriormente incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (1:200, Pierce, EEUU). Esta incubación se hace también en solución bloqueante, de 12 a 16 horas agitándose a 4°C.

- Lavados de nuevo durante 8 horas, cada hora, en PBTx 0.1%, y posterior tratamiento durante 1 hora en PBS + 2 mg/ml de BSA a 4°C.

- Preparación en oscuridad del kit ABC (Pierce) para el revelado, de 30 a 45 minutos antes de su utilización.

- Incubación de las rodajas en el kit ABC durante 2 horas en oscuridad y en el agitador orbital.

- Dos lavados de 5 minutos cada uno con PBTx 0.1%, y posterior mantenimiento de las rodajas durante toda la noche con PBTx 0.1% en el agitador orbital.

- Al día siguiente de nuevo doble lavado con PBTx 0.1% e incubación con DAB (diaminobencidina, Sigma) + 0.3% (vol./vol.) de agua oxigenada,

de 30 minutos a 1 hora en pocillos de cristal protegidos de la luz y en el agitador.

- Lavados con PBS al observar la reacción del cromógeno y antes de que aparezca señal de fondo, y mantenimiento a 4°C hasta el momento del montaje.

- Montaje en portas. Para ello las rodajas se extendieron, se secaron, se les añadió 50% glicerol en PBS + 0.02% (vol./vol.) azida y se cubrieron. Las rodajas una vez montadas se observaron al microscopio óptico y se fotografiaron con una cámara digital acoplada al mismo. En la figura 9 se observa el resultado de una de estas tinciones con anticuerpos anti TH. Las células que aparecen marcadas son células dopaminérgicas tipo I, que se disponen formando glomérulos muy similares en tamaño y forma a los observados en las rodajas cultivadas (Fig. 7).

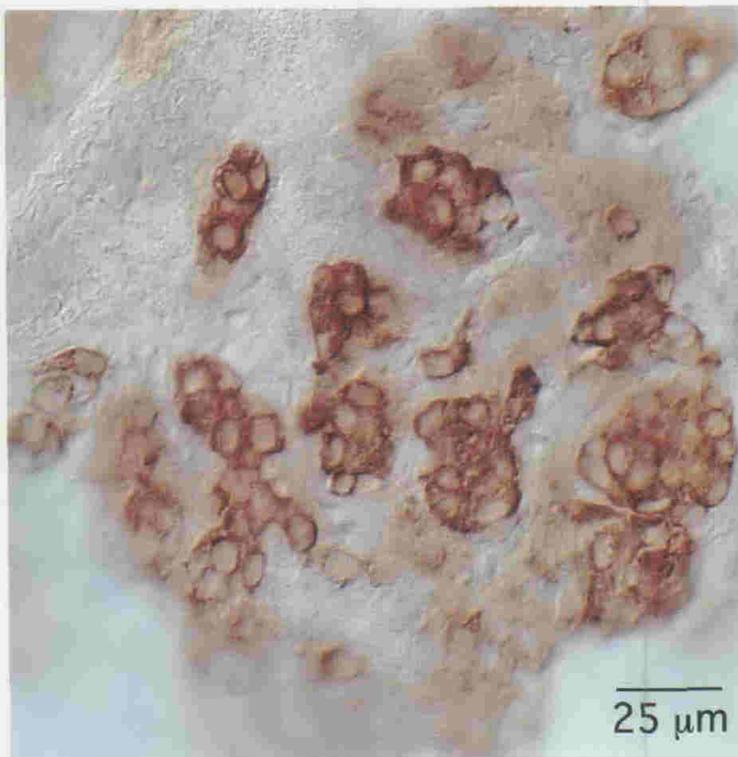


Figura 9: Rodaja de cuerpo carotídeo teñida mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo frente a Tirosina Hidroxilasa.

2. Registro de las corrientes iónicas mediante la técnica de *patch-clamp*

Para estudiar las conductancias iónicas de la membrana en las células glómicas en las rodajas se realizaron experimentos aplicando la técnica de *patch-clamp* adaptada a nuestro laboratorio (Hamill y cols., 1981; López-Barneo, 1991). Esta técnica consiste en establecer una unión muy estable, del orden de gigaohmios de resistencia eléctrica, entre la punta de una pipeta de vidrio y la membrana de la célula. De esta forma puede controlarse el potencial en el microparche de membrana de la célula y estudiar las corrientes iónicas debidas a la apertura de los canales voltaje-dependientes incluidos en la pequeña área de membrana delimitada por la pipeta (configuración *cell-attached*).

Si una vez realizado el sello se aplica una ligera succión en la micropipeta se consigue romper el parche de membrana que delimita la punta de la pipeta. Así se obtiene contacto eléctrico con el interior celular que además se equilibra en pocos minutos con la solución interna de la pipeta. Esta configuración de la técnica de *patch-clamp* se denomina *whole-cell* pues con ella pueden medirse las corrientes iónicas debidas a la apertura de todos los canales presentes en la célula.

2. 1. Dispositivo electrónico

El esquema general del dispositivo electrónico utilizado para los registros de corrientes iónicas transmembrana se muestra en la figura 10. El sistema permite aplicar un pulso de voltaje a la membrana celular a la vez que registrar las corrientes generadas debido a la apertura de canales iónicos voltaje-dependientes. La medida de esta corriente se realiza por medio de un amplificador operacional configurado como convertidor corriente/voltaje (Fig. 10). El voltaje de salida del amplificador V_s es proporcional a la corriente transmembrana I_m según la fórmula:

$$V_s = (R_r \cdot I_m') + V_{ref}$$

donde R_r es la resistencia de retroalimentación del amplificador, I_m' (igual a $-I_m$) la corriente generada por el amplificador para anular la corriente de la membrana I_m , y V_{ref} el valor del pulso de voltaje aplicado a la célula (para mayor detalle ver López-Barneo, 1991; Sakmann y Neher, 1996).

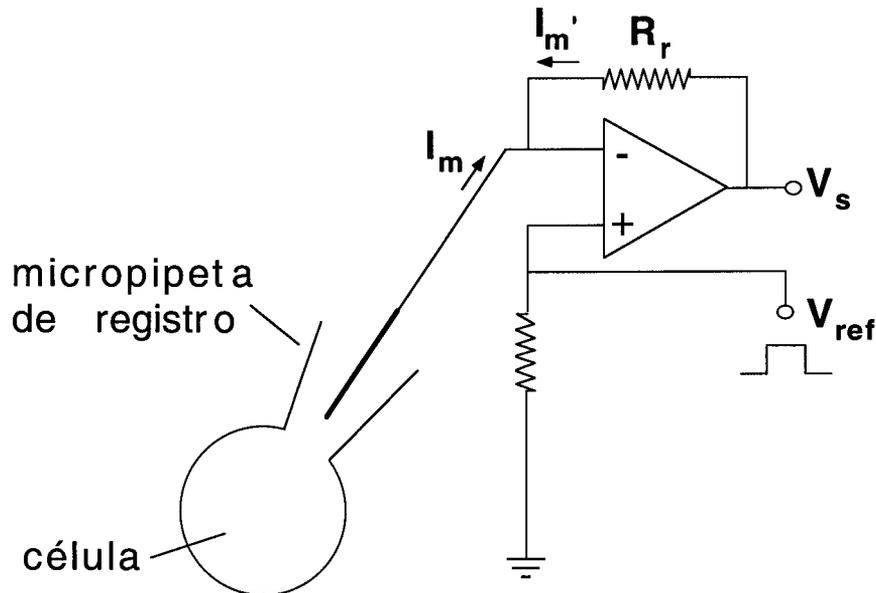


Figura 10. Esquema del amplificador configurado como convertidor corriente/voltaje para el registro de corrientes iónicas transmembrana.

2. 2. Equipamiento

El esquema general del dispositivo experimental utilizado para el registro de las corrientes iónicas se muestra en la figura 11. La corriente fluye por el electrodo hacia el preamplificador o *head-stage*, y de éste a un amplificador EPC-8 (HEKA, Alemania). El filtro utilizado para el registro de corrientes iónicas es interno del amplificador y se fija a una frecuencia de corte de 3 KHz. Posteriormente se digitaliza la señal a 250 Hz con ayuda de una tarjeta conversora analógico-digital (ITC-16, Instrutech Corporation, EE. UU.). Por último, la corriente se graba y almacena en un ordenador Macintosh Performa con 48 Mb de RAM. La adquisición en el ordenador se hace mediante el programa Pulse/PulseFit (versión 8.11,

HEKA, Alemania) y el análisis de los datos con el programa Igor Pro (WaveMetrics, EE. UU.).

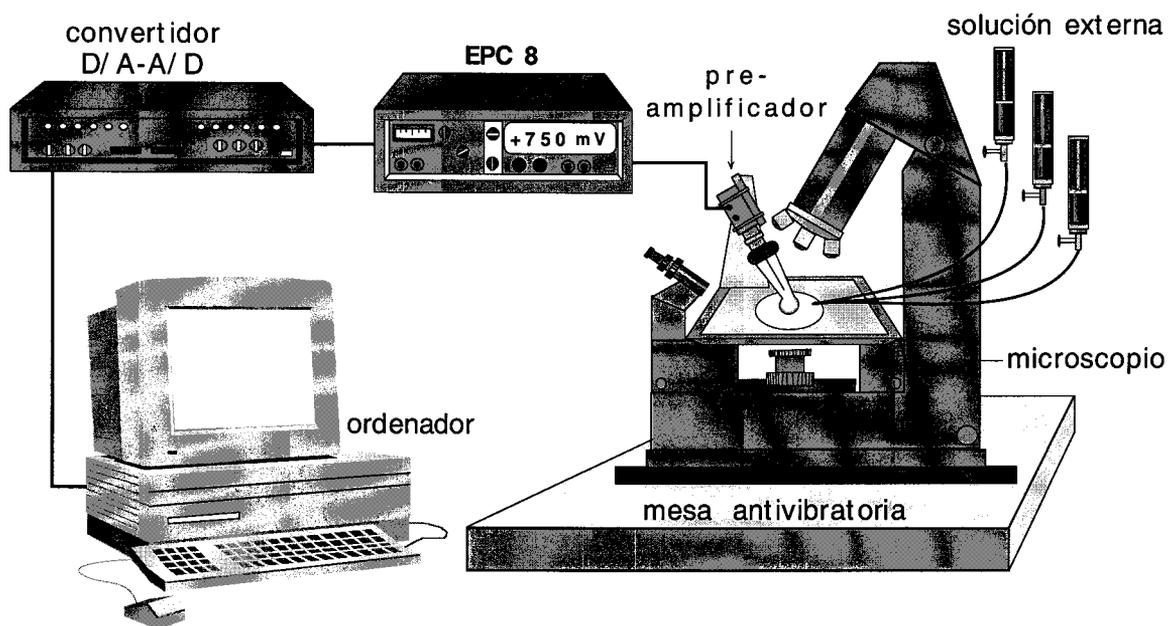


Figura 11. Esquema del equipamiento utilizado para el registro de corrientes iónicas transmembrana.

2. 3. Fabricación de las micropipetas de registro

Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares para hematocrito (Hirschmann Laborgeräte, Alemania). Estos capilares de vidrio se estiraron por calor en un estirador vertical (List Electronics, Alemania), y se les pulió la punta también con calor en una microforja. Este pulido final consigue que el diámetro se reduzca un poco más, y que la superficie de la punta quede más lisa para facilitar el sello. Se utilizaron electrodos que presentaron una resistencia al paso de la corriente de 1-2 M Ω .

Previamente a su utilización los electrodos se rellenaron con solución interna que contenía en mM: 125 KCl, 4 MgCl₂, 4 MgATP, 10 Hepes y 1 EGTA, a la cual se le ajustaba el pH a 7.2 con KOH concentrado, y se mantenía en hielo hasta su utilización.

2. 4. Proceder experimental

En muchos aspectos las rodajas de cuerpo carotídeo fueron manipuladas según los procedimientos descritos previamente para rodajas finas de cerebro (Edwards y cols., 1989; Schneggenburger y cols., 1992). Para la realización de los experimentos se transfirió una rodaja desde el incubador hasta la cámara de registro de un microscopio no invertido Axioskop (Zeiss, Alemania). Este microscopio está equipado con objetivos de inmersión y de larga distancia focal, lo que permite enfocar la rodaja con suficiente aumento pero conservando cierta amplitud del espacio de trabajo. La rodaja se fijó al fondo de la cámara situando encima una lira de platino con varios hilos finos pegados a sus extremos, de forma que los hilos sujetan a la agarosa de la rodaja en el fondo.

La jaula de Faraday utilizada para reducir las interferencias electromagnéticas está conectada a tierra y cubierta por un tejido opaco y grueso que permite calentar todo el *set-up* a una temperatura de aproximadamente 35-37°C. En ocasiones este valor se monitorizó en la propia cámara de registro mediante una fina sonda de temperatura.

Una vez en la cámara la rodaja de cuerpo carotídeo se perfundió de forma continua con solución externa a una tasa de 1 ó 2 ml por minuto. La solución control contenía en mM, 117 NaCl, 4.5 KCl, 23 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂ y 10 Glucosa. La presencia del bicarbonato hace que esta solución tenga pH 7.4 al ser burbujeadada con 5 % CO₂, 20 % O₂ y resto N₂, lo que además consigue una situación normóxica de aproximadamente 140 mm de Hg de pO₂. La solución hipóxica se conseguía en un recipiente independiente que contenía la misma solución pero burbujeadada con 5 % CO₂ y resto N₂, dando como resultado una pO₂ aproximada de 20 a 30 mm de Hg.

La pO₂ en la cámara (Fig. 12) se monitorizó en ocasiones con una fibra de carbono polarizada a -800 mV y con un dispositivo experimental idéntico al utilizado para el registro de las corrientes amperométricas (ver

más adelante). La única diferencia fue que la señal se filtró a 1 Hz en lugar de 100 Hz. Para conocer los valores aproximados de pO_2 en la cámara se llevó a cabo una calibración que se muestra en la figura 12. La anoxia, o 0 mm de Hg de pO_2 , se consiguió con la solución burbujeada con nitrógeno vigorosamente durante más de 10 minutos, y en presencia de 1 mM ditionito sódico, un potente agente secuestrador de oxígeno.

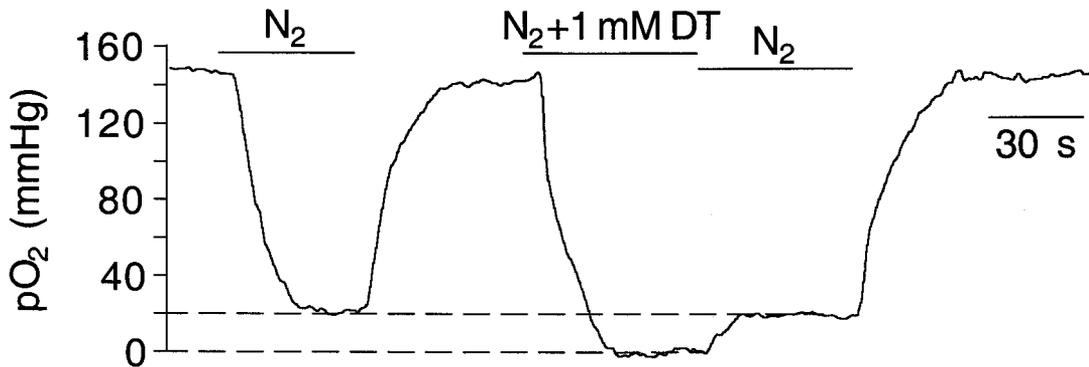


Figura 12. Medida de la pO_2 en la cámara de registro del microscopio mediante una fibra de carbono utilizada como electrodo de oxígeno. Se indican con barras los cambios a las soluciones hipóxica (N_2) y anóxica ($N_2 + 1\text{mM}$ ditionito sódico, DT).

La osmolaridad de la solución externa correspondió al valor esperado de 290 ó 300 mOsm/Kg, y se mantuvo estable a lo largo de todo el experimento debido a que el burbujeo no era nunca excesivamente intenso. Además los recipientes no contenían nunca menos de 100 ó 150 ml de solución, lo que minimizaba el riesgo de cambio de la osmolaridad debido a evaporación. Los bloqueantes y otras drogas utilizadas (todos obtenidos de Sigma, EE. UU.) eran disueltos en pequeños volúmenes de solución externa burbujeada algo más suavemente para que la evaporación no llegase a modificar la osmolaridad. Los niveles de hipoxia alcanzados con este burbujeo eran idénticos a los obtenidos en los recipientes grandes.

Una vez colocada la rodaja en la cámara de registro se observó su aspecto con el objetivo de inmersión de mayor aumento. En caso de no tener glomérulos como los mostrados en la figura 7, se sustituyó por otra. Una micropipeta de vidrio se rellenó de solución interna, se montó en el

preamplificador y se aproximó a una célula de un glomérulo bajo control visual (Fig. 13). Una vez establecido el sello (para detalles ver Hamill y cols., 1981), se ejerció una suave succión al interior de la pipeta para pasar a la configuración *whole-cell*, y así poder estudiar las conductancias iónicas de la membrana.

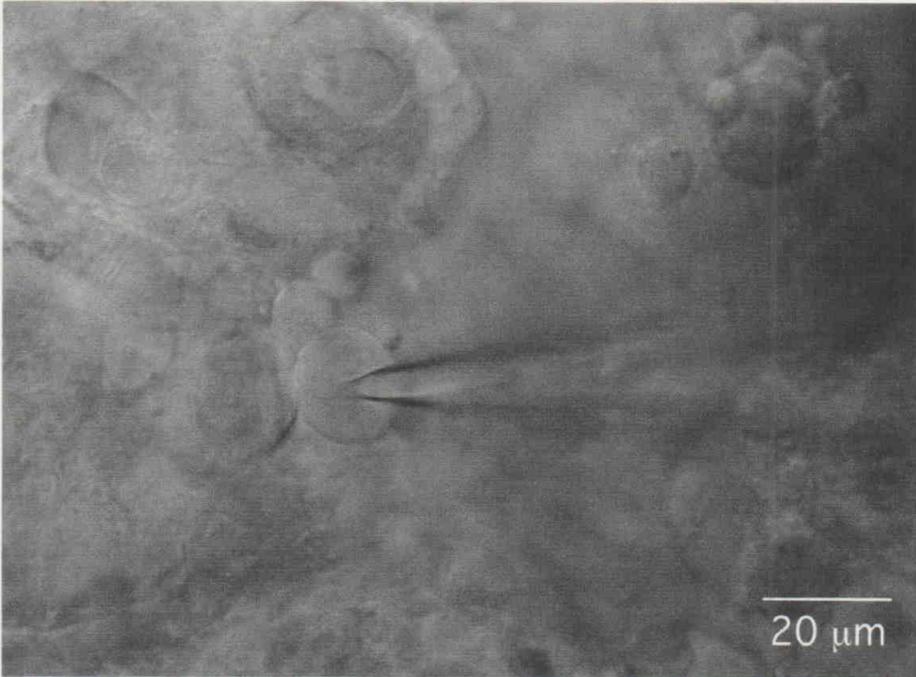


Figura 13. Fotografía en campo claro de una rodaja colocada en la cámara de registro y con una micropipeta tras haber realizado un sello en una célula glómica dentro de un glomérulo.

2. 5. Configuración de registro *whole-cell* y cálculo de los parámetros eléctricos de la membrana celular

El establecimiento de la configuración de *whole-cell* se monitorizó midiendo la capacidad de la membrana (C_m). Esta variable eléctrica es directamente proporcional a la superficie de la célula. Su valor permite por tanto estimar el tamaño celular y estudiar la presencia o no de uniones tipo nexus entre células vecinas, es decir, el grado de acoplamiento eléctrico.

El uso de la técnica de *patch-clamp* en su configuración *whole-cell* para la medida de la capacidad de membrana fue descrita por Neher y

colaboradores (Neher y Marty, 1982; Lindau y Neher, 1988), y consiste en aprovechar las propiedades de la membrana como circuito RC en paralelo. Este modelo eléctrico de membrana se esquematiza en la figura 14B. Los iones sólo pueden atravesar la bicapa a través de canales iónicos, los cuales presentan a su vez una resistencia a este paso según estén o no abiertos. Además la bicapa lipídica se comporta como un condensador, es decir, acumula cargas a ambos lados, cargándose y descargándose tras cada estímulo eléctrico. Esto origina que la membrana se comporte como un circuito RC en paralelo.

Para estudiar únicamente la capacidad, sin contaminación debida a la resistencia de membrana, se aplica un pulso a la célula de tan solo 20 mV de amplitud desde el potencial de reposo. Con este tipo de pulsos se ponen de manifiesto las corrientes capacitativas sin activar canales voltaje-dependientes, por tanto se evita la génesis de corrientes iónicas.

Como se observa en la figura 14A, el paso a la configuración *whole-cell* de la técnica de *patch-clamp* se manifiesta mediante la aparición de dos transientes capacitativos debidos a la carga y descarga del condensador de la membrana. El transiente capacitativo puede ajustarse a una exponencial simple (Fig. 14B) con la siguiente ecuación:

$$I(t) = (I_0 - I_{ss}) \cdot e^{-t/\tau} + I_{ss}$$

donde I_0 es la amplitud de la corriente inicial, I_{ss} la corriente estacionaria, y τ la constante de tiempo de la exponencial. Esta última constante es directamente proporcional a la capacidad de la membrana según las siguientes ecuaciones:

$$R_a = \frac{V_{ref}}{I_0}$$

$$R_m = \frac{V_{ref}}{I_{ss}} - R_a$$

$$C_m = \tau \cdot \left(\frac{1}{R_a} + \frac{1}{R_m} \right)$$

siendo R_a la resistencia de acceso, V_{ref} el voltaje aplicado, R_m la resistencia de la membrana y C_m la capacidad de la membrana. Esta forma de medir la capacidad sólo es cuantitativamente correcta si la resistencia del sello es suficientemente alta como para poder despreciar la fuga de corriente que escaparía por la zona de unión de la membrana con la pipeta.

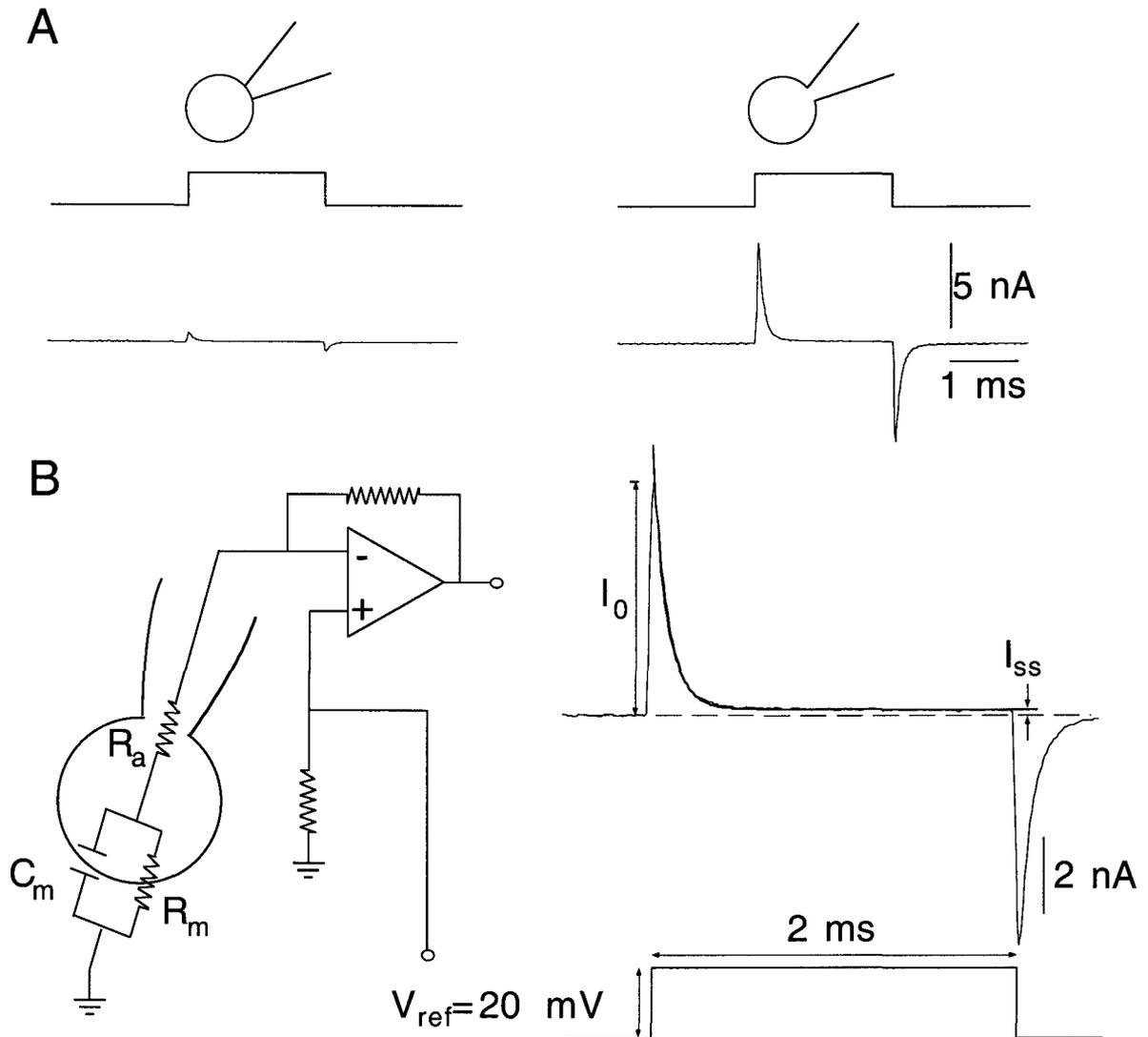


Figura 14. A. Pulsos de voltaje aplicados a la célula para monitorizar el paso a la configuración *whole-cell*. B. Esquema del circuito RC de la membrana celular, y del ajuste exponencial del transiente capacitivo para el cálculo de la capacidad de la membrana.

3. Registro de la actividad secretora celular mediante amperometría

La técnica de registro amperométrico se utiliza para detectar la secreción celular mediante la oxidación de las catecolaminas u otros transmisores oxidables con un electrodo situado próximo a la célula. Este electrodo, que puede ser de platino o bien una fibra de carbono como en nuestro caso, se polariza con un voltaje fijo que supere al potencial redox de la molécula a detectar. De esta forma se consigue la oxidación completa de las moléculas que vayan llegando a la superficie del electrodo.

Al contactar una de estas moléculas el potencial del electrodo hace que se oxide cediendo electrones que generan una corriente. Cuando la liberación es de una vesícula completa llena de catecolaminas, la corriente inducida en la fibra es fácilmente medible con el dispositivo electrónico que a continuación se describe.

3. 1. Dispositivo electrónico de amplificación y registro

El dispositivo electrónico que permite medir la corriente generada en la fibra se ilustra en la figura 15A, y consiste en un amplificador operacional configurado como convertidor corriente/voltaje de forma muy similar a como se explicó para el caso de las corrientes iónicas. La polarización de la fibra se consigue mediante un voltámetro (npi electronic GmbH, Alemania) conectado al amplificador operacional. En este caso el voltaje de salida del amplificador V_s es proporcional a la corriente en la fibra I_m según la misma ecuación, siendo ahora V_{ref} el voltaje de polarización del electrodo (para mayor detalle ver Chow y Von Rűden, 1996).

El equipo utilizado para el registro amperométrico es idéntico al que se esquematizó para el caso de los registros mediante la técnica de *patch-clamp* (Fig. 11), salvo que en el primero hace falta una fuente de voltaje

conectada directamente al amplificador que suministre los 750 mV necesarios para la polarización. Además, en el caso de los registros amperométricos la conexión entre el amplificador EPC-8 y el convertidor analógico-digital es a través de un filtro analógico de paso bajo con frecuencia de corte fijada en 100 Hz.

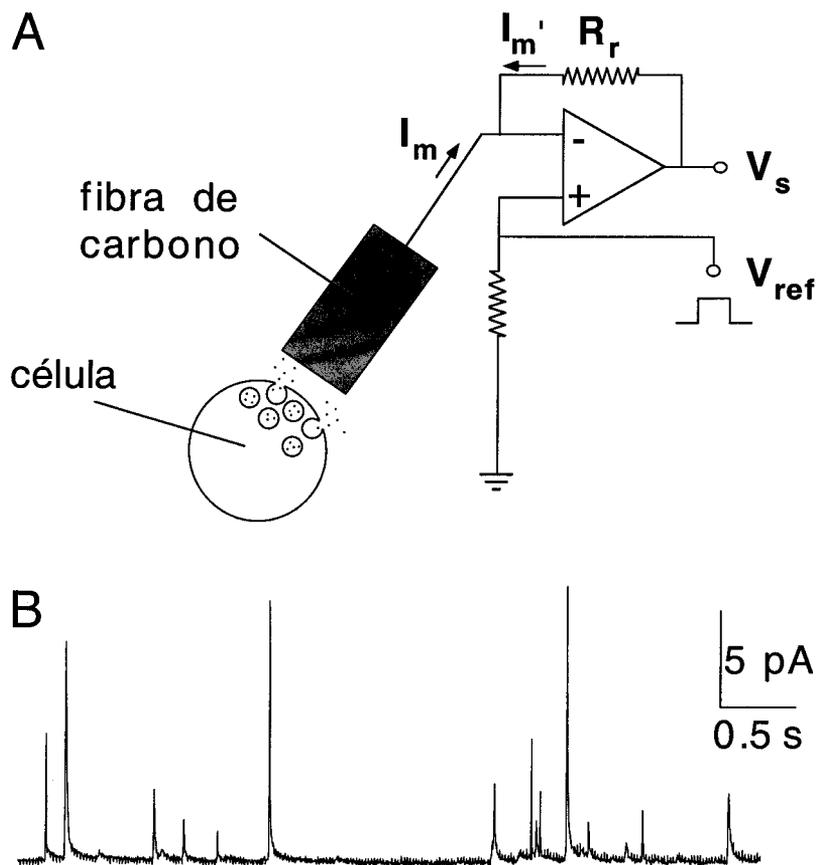


Figura 15. A. Esquema del amplificador configurado como convertidor corriente/voltaje para el registro de corrientes amperométricas. B. Registro amperométrico con eventos únicos de secreción.

La catecolamina mayoritariamente detectada por oxidación con un potencial de polarización de la fibra de +750 mV es la dopamina (Ureña y cols., 1994). Aunque no parece que la dopamina sea el neurotransmisor en la sinapsis glómico-neural (Zhang y cols., 2000), sí es coliberada en las mismas vesículas para ejercer una función posiblemente autorreguladora de la secreción (Benot y López-Barneo, 1990; Bairam y cols., 2000).

3. 2. Señal amperométrica y eventos únicos de secreción

En la figura 15B se muestra un ejemplo de un registro amperométrico donde se observan eventos discretos de corriente. Cada uno de estos eventos corresponde a la fusión de una sola vesícula con la membrana plasmática (Whightman y cols., 1991; Chow y cols., 1992; Álvarez de Toledo y cols., 1993; Ureña y cols., 1994). A estas corrientes se les denomina espigas amperométricas, y expandidas tienen el aspecto que se muestra en la figura 16.

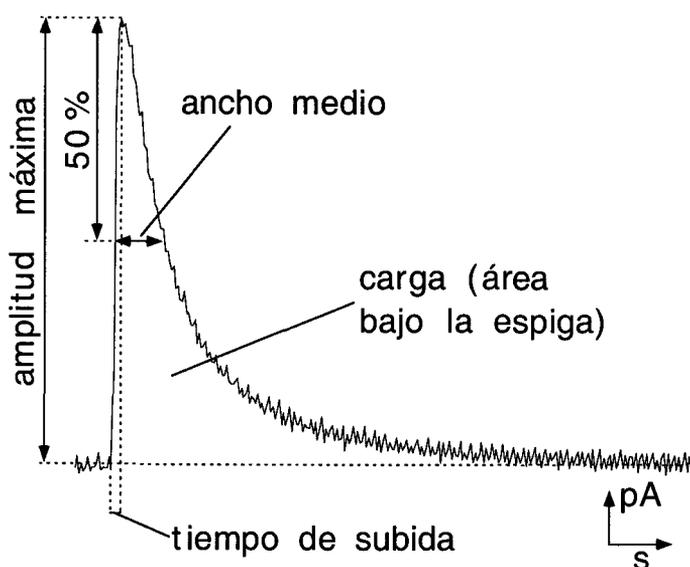


Figura 16. Parámetros característicos de una espiga amperométrica.

Una espiga amperométrica se caracteriza por una serie de parámetros como son el *tiempo de subida*, el *ancho medio* y la *carga* (Fig. 16). El *tiempo de subida* es el tiempo que tarda la corriente en alcanzar su valor máximo. El *ancho medio* es el tiempo que discurre desde que la corriente alcanza el 50% de su valor máximo en la fase de subida hasta que lo hace en la fase de bajada. Y la *carga* corresponde al área bajo la espiga, es decir a la integral de la corriente generada. De esta *carga* podemos estimar el número de moléculas de catecolaminas liberadas en esa vesícula concreta si aplicamos la siguiente ecuación:

$$Q = \int I \cdot dt = z \cdot e \cdot M$$

donde Q representa la carga total implicada en la reacción redox, I la corriente generada, z el número de electrones liberados por cada molécula, e la carga unitaria (1.6×10^{-19} culombios) y M el número total de moléculas oxidadas.

Cuando se calcula la *carga* de los eventos amperométricos se descartan todas aquellas espigas que sean excesivamente lentas, es decir, que tengan un *tiempo de subida* superior en nuestro caso a 8 ms. Estos eventos son debidos a fusiones de vesículas demasiado lejos de la fibra, y por tanto la detección va acompañada de una gran pérdida de catecolaminas por difusión en otras direcciones.

El resultado de las mediciones de la *carga* y de las frecuencias de secreción en espigas por minuto, se presentan en “Resultados” como la media \pm la desviación estándar de la media. La comparación entre las distintas medias se realizó mediante el test t-Student, asumiendo que las distribuciones son normales. El valor de α a partir del cual la diferencia se consideró significativa fue de 0.05.

3. 3. Fabricación de los electrodos de fibra de carbono

Los electrodos para los registros amperométricos se elaboraron según el protocolo descrito por Chow y Von Rüden (1996), el cual se detalla a continuación:

- Se utilizaron fibras de grafito sintéticas de 12 μm de diámetro (AMOCO, EE. UU.). El procedimiento consiste en aislar eléctricamente la fibra y sujetarla firmemente en un electrodo para poder exponer un extremo a la célula y facilitar la conexión del otro extremo al amplificador.

- Primero se introdujo la fibra en un trozo de tubo de polietileno (diámetro externo: 0.8 mm, diámetro interno: 0.4 mm, Portex, Inglaterra). Para ello se usaron unas pinzas con las puntas envueltas en plástico para

evitar romper la fibra. También facilitó el proceso el llenado previo del tubo de polietileno con acetona, la cual disminuye la atracción electrostática entre las paredes del tubo y la fibra. Una vez introducida la fibra se eliminó la acetona apoyando el extremo del tubo sobre un papel absorbente.

- Para fijar la fibra al polietileno y poder exponer un trozo de carbono hacia el exterior se calentó el tubo en el centro aproximándolo a una resistencia incandescente. El calor hace retraerse al polietileno hacia ambos extremos dejando una zona en el centro con tan solo una fina capa de polietileno totalmente pegada a la fibra de carbono. Se cortó justo por el centro de esta zona dando como resultado dos electrodos independientes. Se aproximó de nuevo el extremo más fino del tubo al calor para retraer algo más al polietileno y dejar así un pequeño tramo de fibra al descubierto.

- Por último se fijó el electrodo a un capilar de vidrio (capilar para hematocrito como los utilizados para *patch-clamp*) mediante Sylgard como pegamento eléctricamente aislante. Tanto el tubo de polietileno como el capilar de vidrio se rellenaron con una solución 3 M de KCl previamente a la utilización del electrodo, para permitir el contacto eléctrico entre la fibra de carbono y el hilo de plata del preamplificador.

El aspecto final de un electrodo de amperometría se muestra en el esquema de la figura 17.

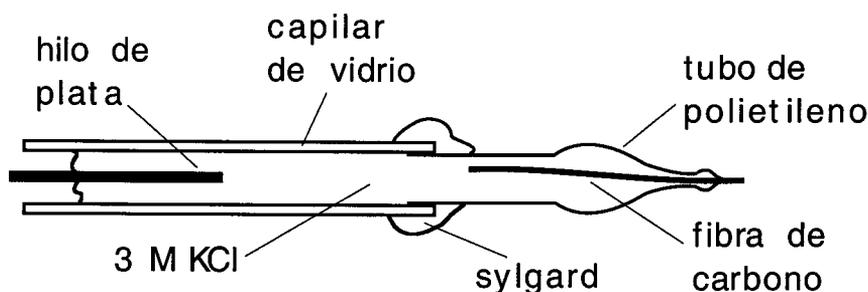


Figura 17. Esquema ilustrativo del aspecto final de un electrodo de fibra de carbono para registro amperométrico.

Para reutilizar un electrodo que ya ha estado en contacto con alguna rodaja bastó con retraer un poco por calor el polietileno que cubre a la fibra

de carbono. Posteriormente se cortó el trozo de fibra que contiene restos celulares que entorpecen la nueva medición.

3. 4. Proceder experimental

Para la realización de los experimentos se transfirió una rodaja de cuerpo carotídeo a la cámara de registro, de igual forma a como se indica en el apartado de registro de corrientes mediante la técnica de *patch-clamp*. También es idéntica la perfusión de la rodaja con solución externa, la composición de ésta, y el burbujeo de la misma, así como la temperatura del *set-up* conseguida con un calentador bajo la mesa antivibratoria.

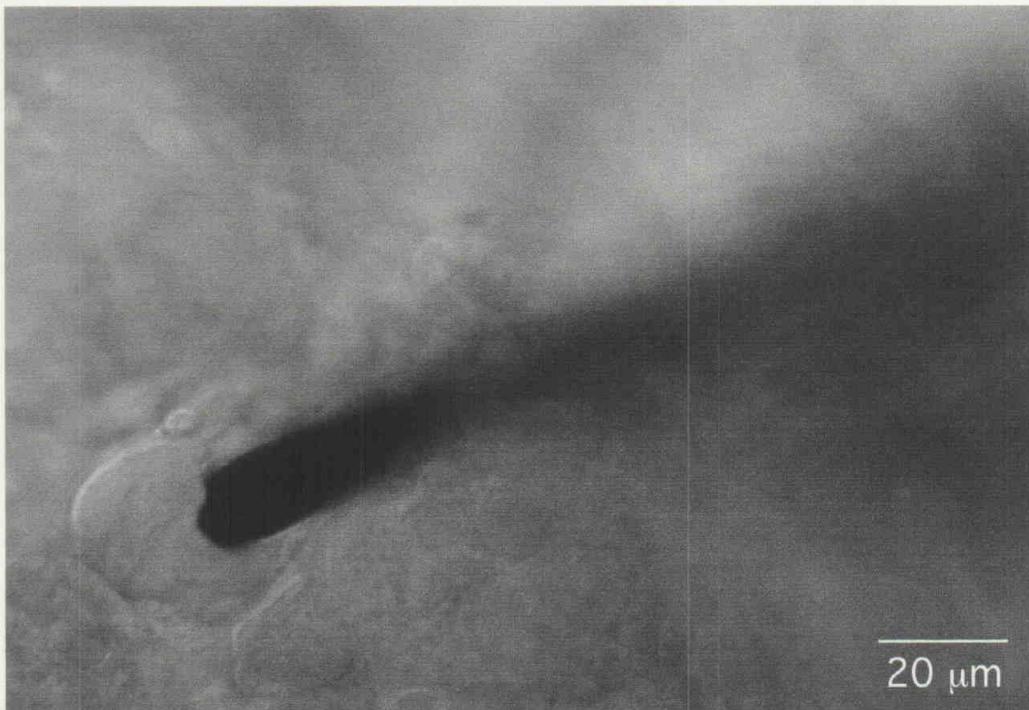


Figura 18. Fotografía en campo claro de una rodaja de cuerpo carotídeo colocada en la cámara de registro y con la fibra de carbono colocada sobre un glomérulo de células glómicas.

La fibra de carbono se posicionó sobre uno de los glomérulos a la vez que se activó el sistema de adquisición. Entonces se desplazó la fibra hasta contactar con el glomérulo, e incluso se presionó un poco para quedar en contacto directo con la célula glómica (Fig. 18). En ocasiones la presión

excesiva sobre el glomérulo dió lugar a un aumento brusco de la secreción en respuesta al estímulo mecánico y a la depleción en las células del *pool* de vesículas liberables por la entrada de calcio. Un ejemplo de depleción producida por un estímulo mecánico se muestra en la figura 19, donde se observa la secreción masiva tras el contacto de la fibra de carbono con la célula (flecha) y la desaparición de la respuesta secretora al alto potasio extracelular (ver más adelante).

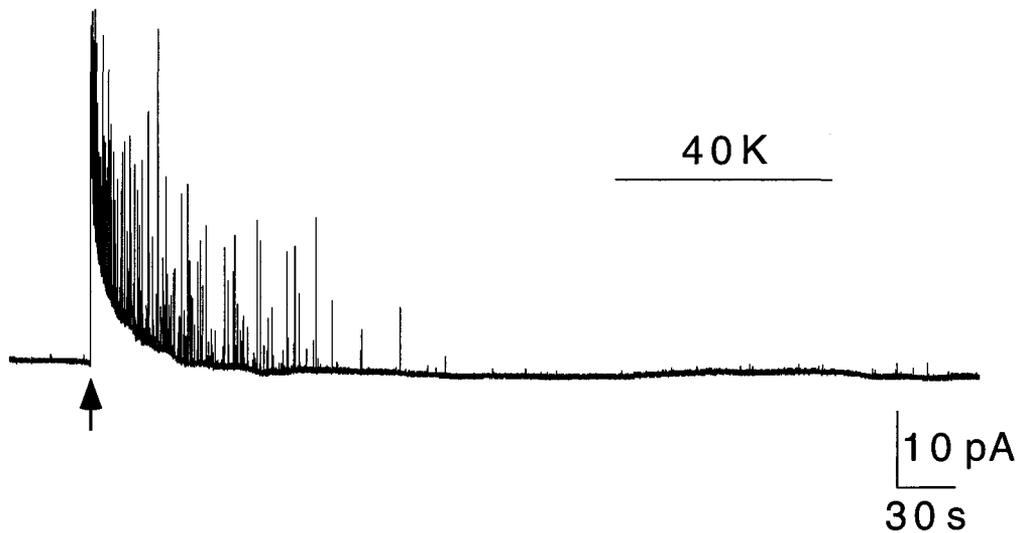


Figura 19. Registro amperométrico obtenido tras el contacto brusco de la fibra de carbono con un glomérulo, momento indicado por la flecha. Se pone de manifiesto la depleción de vesículas mediante una exposición a solución externa con alto potasio (40 mM KCl sustituyendo equimolarmente a NaCl).

RESULTADOS

1. Características generales de las células del cuerpo carotídeo en rodajas

El primer objetivo del presente trabajo fue la puesta a punto de una nueva preparación de rodajas finas de cuerpo carotídeo de rata (presentado en el capítulo "Materiales y Métodos"), y la caracterización general de las propiedades electrofisiológicas de las células glómicas (tipo I) dentro de las rodajas. Este estudio inicial nos permitió contrastar las propiedades celulares en las rodajas con lo descrito previamente en células aisladas.

1. 1. Propiedades electrofisiológicas

Las células se estudiaron mediante la técnica de *patch-clamp* en su configuración *whole-cell* (ver "Materiales y Métodos"). Alrededor de un 23% (n=26) de las 110 células en las que se obtuvieron registros estables no mostraron corrientes en respuesta a pulsos despolarizantes de voltaje, o bien tenían tan solo una pequeña corriente transitoria de potasio. Estas

últimas son posiblemente células sustentaculares o tipo II presentes en el cuerpo carotídeo (Fidone y González, 1986), y cuyas propiedades electrofisiológicas han sido descritas previamente (Duchen y cols., 1988; Ureña y cols., 1989). En la figura 20 (panel de la derecha) se muestran dos ejemplos de registros obtenidos en células tipo II. Para facilitar la comparación se añaden en el panel de la izquierda registros típicos en una célula glómica o tipo I en respuesta a los mismos pulsos despolarizantes.

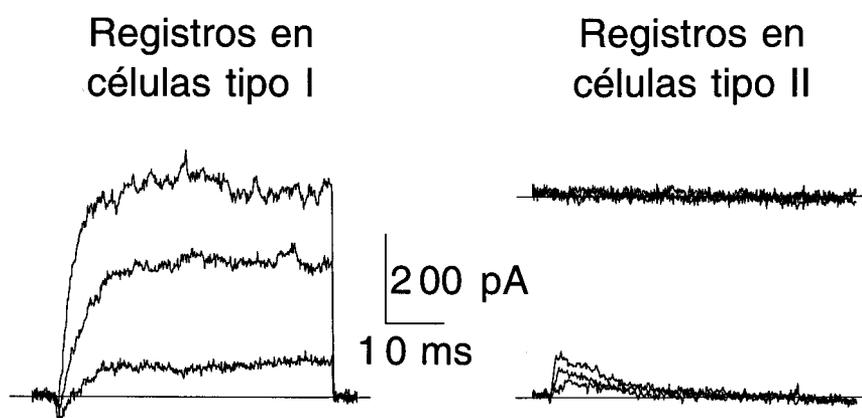


Figura 20. Corrientes de membrana generadas en tres células distintas en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes de 50 ms de duración, desde un potencial de membrana de -80 mV hasta -20, 0 y +20 mV.

Los parámetros eléctricos pasivos de las células glómicas se estudiaron mediante la técnica de *patch-clamp* (ver "Materiales y Métodos") a partir de 32 registros estables, y los resultados se presentan en la tabla 1. La resistencia de acceso R_a mostró un valor acorde con lo descrito previamente, equivalente a dos o tres veces la resistencia del electrodo. La resistencia de membrana R_m resultó ser bastante menor que los valores de 0.7 a 5 G Ω descritos en células dispersas (Duchen y cols., 1988). Dado que R_m se mide en paralelo con la resistencia del sello, estos datos podrían deberse a la alta temperatura (35-37°C) a la que se realizaron los experimentos, que se sabe decrece la resistencia de la unión de la pipeta con la membrana. También podría influir la presencia sobre las células glómicas de fibras o restos celulares que dificulten el sellado. La superficie celular en la rodaja no es tan lisa y birrefringente como en el caso de las

células dispersadas enzimáticamente. De hecho, en ocasiones es necesaria una limpieza previa del tejido mediante succión con microelectrodos de vidrio para retirar todo ese material. Finalmente, otro factor que ocasionaría la disminución en la resistencia de membrana es la posible conexión entre células mediante uniones tipo nexus, tal y como ha sido descrito por algunos autores (Abudara y Eyzaguirre, 1994).

Tabla 1

	R_a (M Ω)	R_m (M Ω)	C_m (pF)
n=32	7.3 ± 5	340 ± 200	14.6 ± 5

La capacidad de membrana (C_m) obtenida a partir de la R_m (ver "Materiales y Métodos") es mayor a la descrita previamente en células aisladas ($\approx 6-7$ pF; Duchén y cols., 1988; Ureña y cols., 1989). Asumiendo una capacidad específica de membrana de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ estos valores de capacidad resultarían en un diámetro medio para las células glómicas en las rodajas de $16 \pm 5.5 \mu\text{m}$ ($n=32$). Este valor es claramente diferente del tamaño celular observado al microscopio (ver Fig. 8) y al diámetro descrito en células aisladas ($\approx 10-12 \mu\text{m}$; Duchén y cols., 1988). Se puede concluir por tanto que la técnica de *patch-clamp* no nos permite hacer un estudio cuantitativamente preciso de los parámetros eléctricos pasivos de las membranas de las células glómicas en rodajas, debido a algunos o todos los factores expuestos anteriormente.

Se estudiaron las corrientes voltaje-dependientes de 84 células glómicas en glomérulos dentro de las rodajas. Algunas de estas células ($n=7$) mostraron corrientes de entrada considerables, con un valor medio de amplitud en el pico de la corriente a 0 mV de -1.7 ± 0.5 nA. El resto presentaron corrientes de entrada pequeñas en comparación con las corrientes de salida. En la figura 21 se muestran registros electrofisiológicos de una de las siete células con corrientes de entrada de gran amplitud. A la

derecha de la figura se representa la curva corriente/voltaje (I/V) medida en el pico de la corriente entrante.

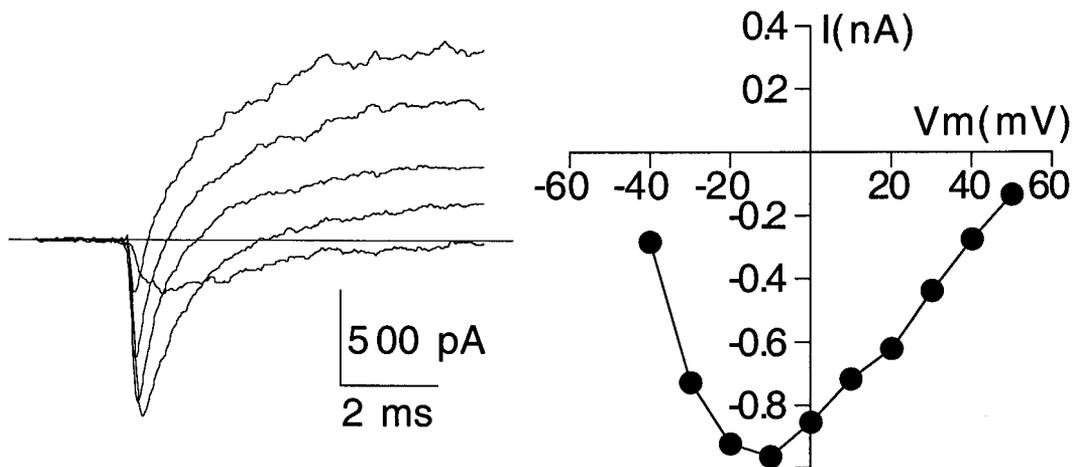


Figura 21. Corrientes de entrada en una célula glómicica dentro de un glomérulo, en respuesta a pulsos despolarizantes de 10 ms de duración desde -80 mV de potencial de reposo hasta -40, -20, 0, +20 y +40 mV de potencial de membrana. A la derecha curva corriente/voltaje, con la amplitud medida en el pico de la corriente entrante.

Aunque la caracterización farmacológica de las corrientes de entrada de gran amplitud no fue un objetivo de este trabajo, su forma y la relación corriente/voltaje son muy parecidas a las de las corrientes de sodio descritas en células dispersas del cuerpo carotídeo de rata (Stea y cols., 1995, López-López y cols., 1997). De hecho, el porcentaje resultante de células glómicicas con corrientes de entrada de gran amplitud en las rodajas (8.5%) es muy similar al porcentaje de células con corrientes de sodio que se registran en preparaciones de células dispersadas enzimáticamente (López-López y cols., 1997).

Las células glómicicas estudiadas en las rodajas mostraron todas corrientes de salida, presumiblemente corrientes de potasio, aunque no fueron analizadas con detalle. La variabilidad en la forma de las corrientes de salida generadas en respuesta a pulsos despolarizantes de 50 ms de duración es relativamente grande dentro de una misma rodaja. La mayoría de las células tenían unas corrientes de salida como las que se muestran en

la figura 22A. En la curva corriente/voltaje representada a la derecha del panel se observa cómo la corriente decrece a los potenciales de despolarización más positivos. Esta forma típica de la curva I/V es característica de corrientes macroscópicas con un componente importante debido a la activación de canales de potasio dependientes de calcio descritos en células glómicas dispersas de cuerpo carotídeo de rata (Wyatt y Peers, 1995; López-López y cols., 1997).

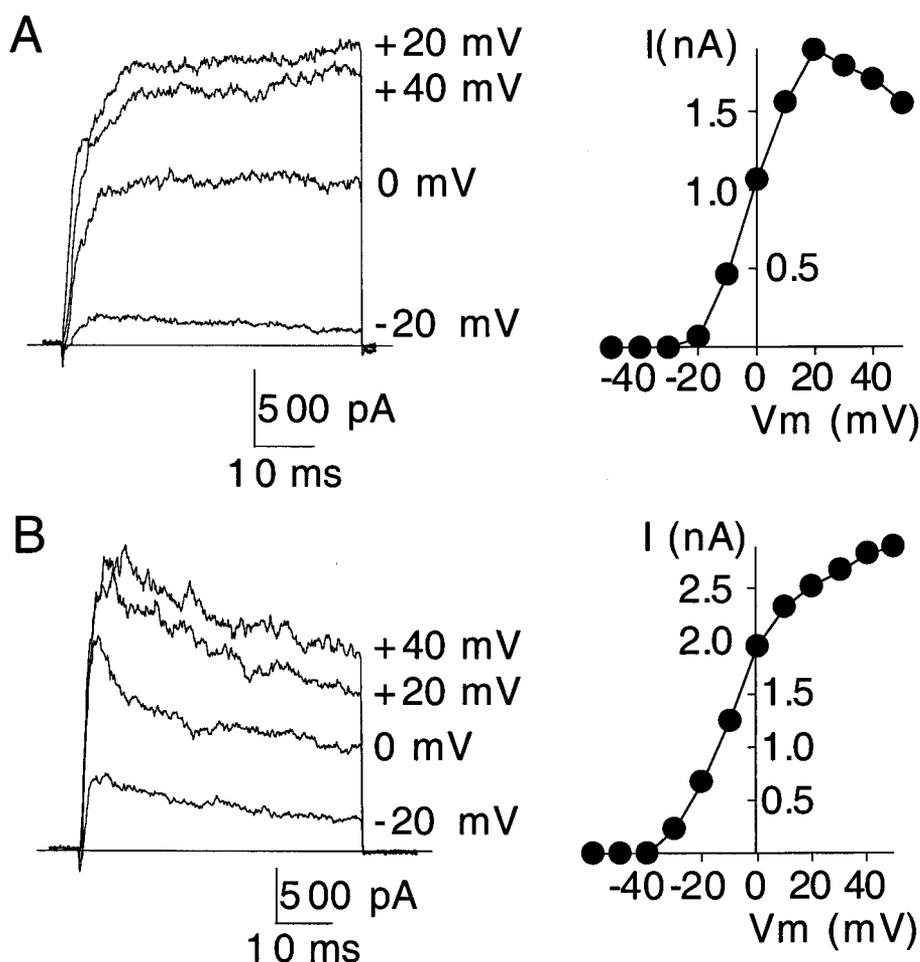


Figura 22. Corrientes de salida en dos células glómicas de diferentes glomérulos en respuesta a pulsos despolarizantes de 50 ms de duración desde -80 mV de potencial de reposo hasta el potencial indicado. A la derecha de cada panel se muestra la correspondiente curva corriente/voltaje.

Cuando la corriente presumiblemente debida a los canales de potasio dependientes de calcio es menos evidente, se ponen de manifiesto otras corrientes macroscópicas de potasio. En la figura 22B se muestra un ejemplo de registros pertenecientes a este otro tipo de células, expresando

canales de potasio que dan lugar a corrientes con inactivación más rápida. En la curva I/V representada a la derecha del panel se observa claramente la ausencia del componente dependiente de calcio.

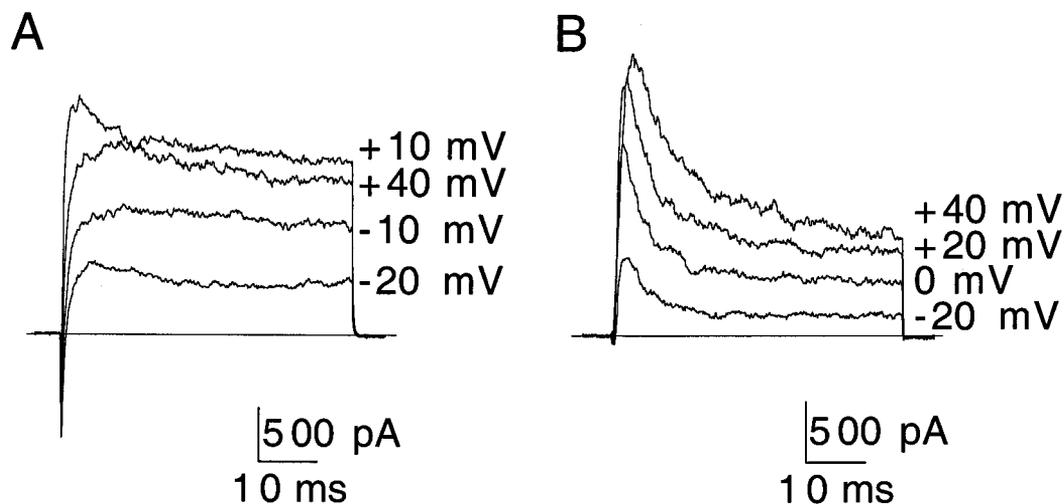


Figura 23. Corrientes iónicas en dos células glómicas de diferentes rodajas, en respuesta a pulsos despolarizantes de 50 ms de duración desde -80 mV de potencial de reposo hasta el potencial indicado.

La variabilidad antes mencionada determina que muchas células tengan varios tipos de corrientes distintas. Los registros de la figura 23A pertenecen a una célula con corrientes de salida que tienen un claro componente de inactivación rápida e independiente de calcio, y otro componente más lento y con decremento de amplitud a los voltajes más positivos. En otras células predomina claramente un solo tipo de corriente, siendo, en el caso mostrado en la figura 23B, la corriente transitoria de potasio con inactivación rápida. No se estudió en este trabajo si la variabilidad descrita es fruto de heterogeneidad en la población de células glómicas, o por el contrario es debida a la presencia de otro tipo de células como neuronas simpáticas y parasimpáticas, que se sabe existen interglomerularmente en el cuerpo carotídeo (ver "Introducción"; Fidone y González, 1986).

1. 2. Actividad secretora

El estudio de la actividad secretora de las células glómicas en las rodajas se llevó a cabo mediante la detección por oxidación de las catecolaminas liberadas en diferentes situaciones experimentales. En general, las células glómicas en las rodajas mostraron poca secreción espontánea, aunque habitualmente no inferior a uno o dos eventos de secreción por minuto. Algunas células tuvieron una secreción basal mucho más alta que el resto (Fig. 24), llegando a unas 35-40 espigas amperométricas por minuto. Esta secreción espontánea elevada podría ser debida simplemente a la estimulación mecánica de la célula por un contacto algo más brusco de lo normal de la fibra con la célula al inicio del experimento (flecha en la Fig. 24; ver “Materiales y Métodos”).

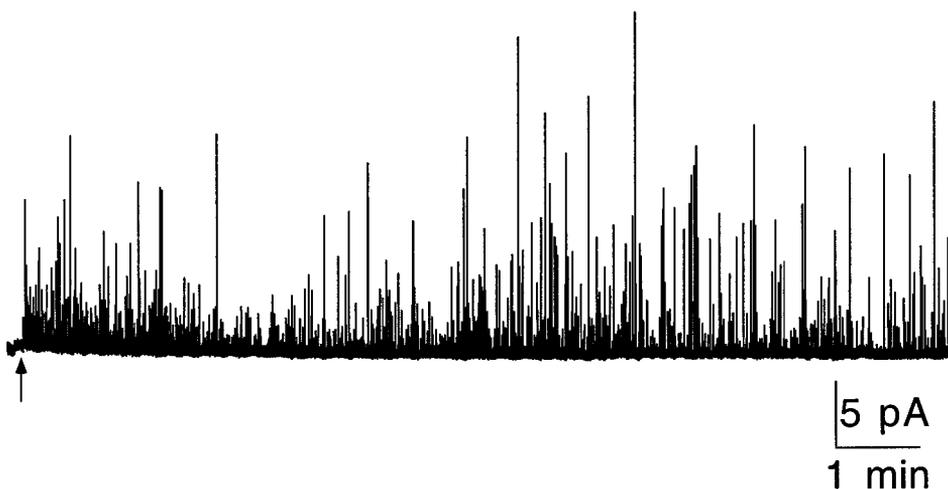


Figura 24. Señal amperométrica generada en la fibra de carbono tras acercarla a una célula glómica, momento indicado por la flecha. Cada espiga corresponde a la fusión espontánea de una vesícula de catecolaminas con la membrana.

Las 4 células que tuvieron secreción basal elevada se utilizaron para el estudio de las características eléctricas de los eventos de secreción espontáneos. Se calculó la *carga* de todos aquellos eventos de secreción que cumplieran con los criterios de selección marcados en “Materiales y Métodos”. De esta forma se descartaron los eventos más lentos debidos a fusiones que tenían lugar lejos de la fibra, bien en la zona de la membrana celular más alejada de la fibra, o bien en membranas de células adyacentes.

Estos eventos no son adecuados para ser incluidos en el cálculo de la *carga* vesicular pues van acompañados de una gran pérdida de catecolaminas por libre difusión en otras direcciones.

El valor medio estimado de la *carga* de las espigas amperométricas de secreción espontánea es de 44.8 ± 30 fC ($n=474$ espigas en 4 células). Si se representa el histograma de frecuencias se observa que la variable sigue una distribución normal (Fig. 25). El valor medio de la *carga*, asumiendo que cada molécula de catecolamina cede dos electrones a la fibra (ver "Materiales y Métodos"), corresponde a unas 140.000 ± 90.000 moléculas de catecolaminas por vesícula. El resultado es muy similar al descrito previamente tanto para células glómicas dispersas de conejo (Ureña y cols., 1994) como de rata (Carpenter y cols., 2000).

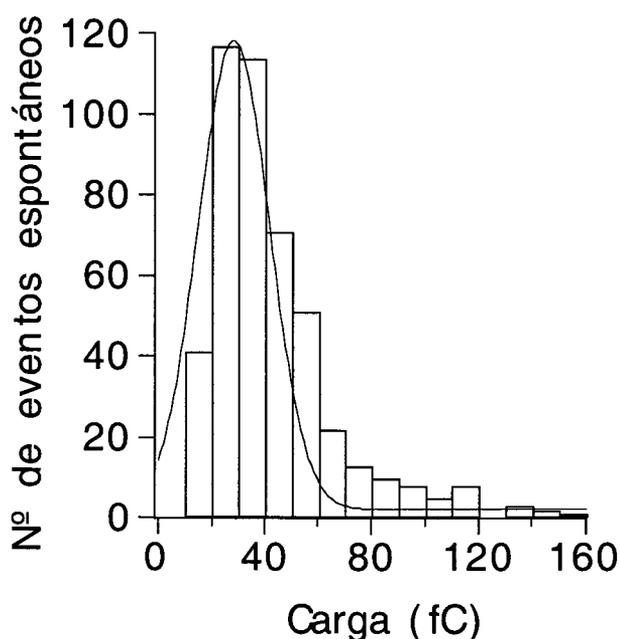


Figura 25. Histograma de frecuencias de la variable *carga* medida en eventos inducidos por secreción espontánea. Se muestra el ajuste a una normal.

Las células glómicas son excitables y su secreción es voltaje-dependiente. En estas células es de esperar que los estímulos que induzcan despolarización de la membrana provoquen la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes, la entrada de calcio y la activación de la secreción. La sustitución equimolar de cloruro de sodio por cloruro de

potasio en la solución externa desplaza el potencial de equilibrio para el potasio hacia valores más despolarizados. Al ser el potasio el ión que goza de mayor permeabilidad en reposo, rápidamente el potencial de membrana tiende hacia el potencial de equilibrio para el potasio, provocando una despolarización. En muchas ocasiones a lo largo del presente trabajo se utilizó la secreción evocada por alto potasio como medida del estado general de la maquinaria de secreción celular. Esta respuesta a alto potasio extracelular está anteriormente descrita en células glómicas dispersadas enzimáticamente (Ureña y cols., 1994; Montoro y cols., 1996).

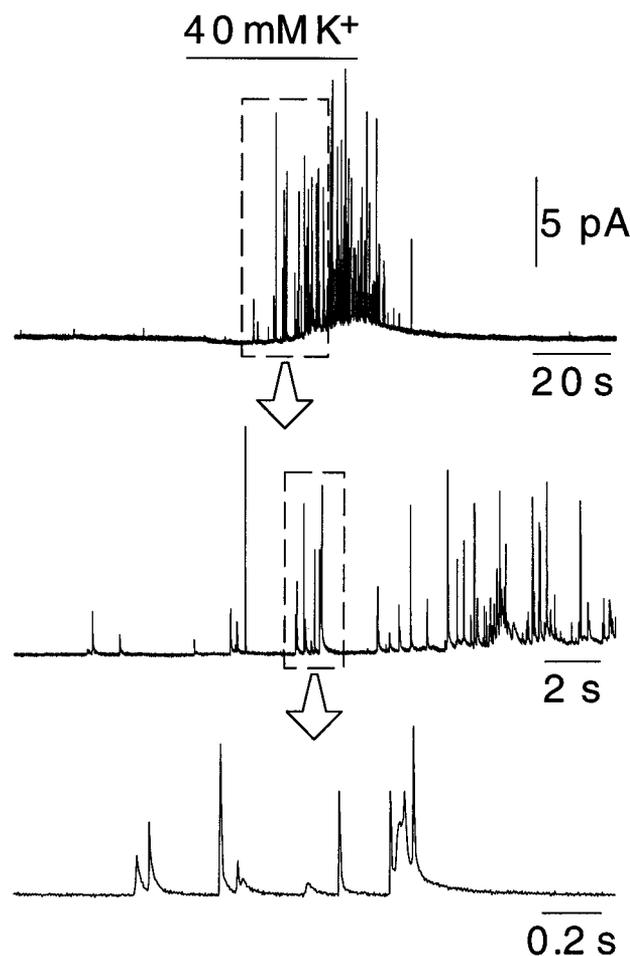


Figura 26. Respuesta secretora de una célula glómica en una rodaja a la aplicación de solución externa con alto contenido de potasio (40 mM KCl).

En la figura 26 se muestra la respuesta secretora de una célula glómica en una rodaja tras cambiar la solución externa control por una solución que contiene en mM: 77 NaCl, 40 KCl, 23 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 2.5

CaCl₂ y 10 Glucosa. La célula genera una ráfaga de secreción a partir de unos 20 segundos tras el cambio de solución, fenómeno totalmente reversible tras varios segundos en la solución externa control. La frecuencia de eventos de secreción se hace tan alta que las espigas amperométricas llegan a fusionarse unas con otras, como se observa en la expansión de la escala de tiempo de la figura 26. Además aparece una onda envolvente en la línea de base debido a la fusión de los eventos únicos y a la actividad secretora de células en otras zonas de la rodaja. Los eventos de secreción celular inducidos por alto potasio poseen un valor medio de *carga* de 40.3 ± 17.6 fC (n=293 eventos en 7 células). Este valor es muy similar al obtenido para el caso de los eventos de secreción espontáneos, por tanto parece que el tipo de vesículas dopaminérgicas secretadas espontáneamente o en respuesta al alto potasio es el mismo.

2. Respuesta a hipoxia de las células glómicas en rodajas

2. 1. Corrientes iónicas sensibles a la pO₂

Aunque el objetivo principal del presente capítulo fue caracterizar la respuesta secretora a la hipoxia de las células glómicas en las rodajas, se realizaron algunos experimentos con la técnica de *patch-clamp* para corroborar el efecto inhibitorio de la hipoxia sobre las corrientes de potasio de células glómicas de rata, fenómeno ampliamente descrito en células dispersas (Peers, 1990; Stea y Nurse, 1991; Wyatt y Peers, 1995; López-López y cols., 1997). El cambio de la solución externa normóxica a hipóxica (cambio de pO₂ de 150 a ≈ 20 mm de Hg) produjo una inhibición reversible de aproximadamente un 20% de las corrientes de potasio (Fig. 27). La curva I/V mostrada a la derecha de la figura sugiere que es el componente calcio dependiente de la corriente el que se inhibe por la hipoxia. Este efecto del descenso de la pO₂ sobre las corrientes de potasio de

células glómicas en rodajas es por tanto muy similar al descrito previamente en células aisladas (Peers, 1990).

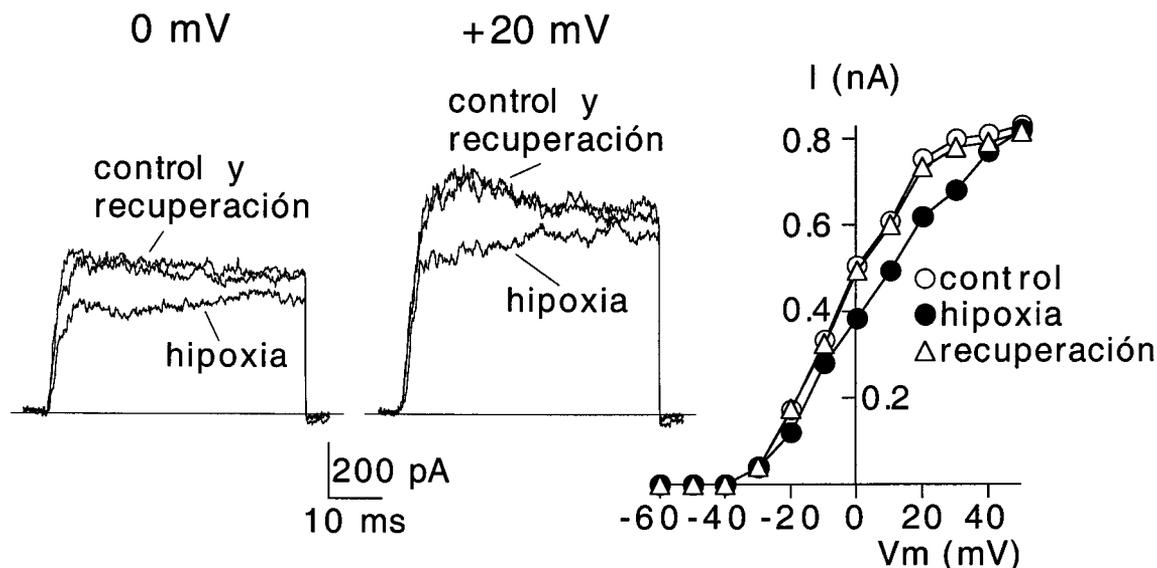


Figura 27. Corrientes de potasio generadas en una célula glómica en respuesta a pulsos despolarizantes desde -80 mV hasta 0 ó $+20$ mV, en presencia de soluciones normóxica e hipóxica. A la derecha se muestra la curva corriente/voltaje que representa la amplitud de la corriente medida al final del pulso, frente al voltaje de despolarización.

2. 2. Estimulación de la actividad secretora

La respuesta secretora a la hipoxia de una célula glómica en una rodaja se ilustra en la figura 28. Se observa cómo al cabo de medio minuto aproximadamente desde el comienzo del estímulo la célula comienza a aumentar su frecuencia de secreción de vesículas. En este caso la actividad secretora aumentó desde 4 ó 5 espigas por minuto de secreción basal hasta unas 50 espigas por minuto en hipoxia. La recuperación de los niveles basales de secreción una vez llegado el oxígeno es muy rápida, necesitando tan solo unos pocos segundos. El promedio de la frecuencia de eventos de secreción en respuesta a la hipoxia medida en el minuto tras 90 segundos de exposición es de 48.6 ± 19 espigas por minuto ($n=24$ células).

Los eventos de secreción inducidos por la hipoxia presentan un valor medio de *carga* de 43 ± 26 fC ($n=576$ eventos en 14 células), lo que, asumiendo que se ceden a la fibra de carbono dos electrones por molécula

de catecolamina liberada, corresponde a 135.000 ± 80.000 moléculas por vesícula. Estos valores no son significativamente diferentes a los obtenidos para eventos espontáneos o eventos inducidos por alto potasio (ver capítulo anterior). Parece por tanto que la despolarización y la exposición a hipoxia liberan el mismo tipo de vesícula catecolaminérgica.

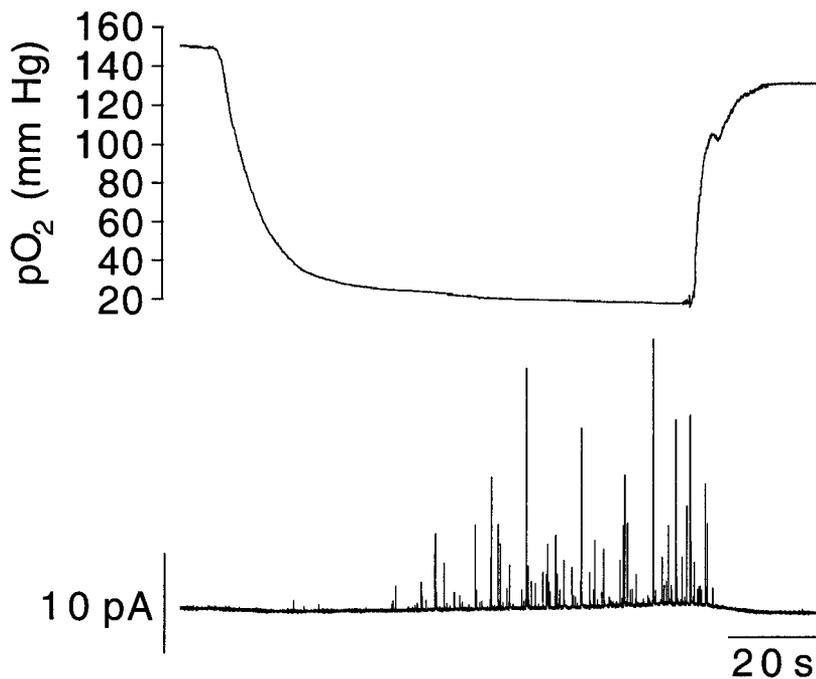


Figura 28. Cambios de la presión parcial de oxígeno en la cámara de registro durante un experimento de exposición a hipoxia, y respuesta secretora registrada paralelamente en una célula glómica.

Los registros amperométricos permiten también distinguir entre dos comportamientos distintos de las células glómicas durante la exposición a hipoxia. Existen células, como la descrita anteriormente en la figura 28, que aumentan la actividad secretora (Fig. 29A). Sin embargo algunas células, aunque activables por la despolarización con alto potasio, no aumentan su secreción en respuesta al descenso en la pO₂ (Fig. 29B). Las células insensibles a la hipoxia podrían tener un mecanismo sensor de oxígeno alterado o desacoplado de los canales de membrana, ya que se observan con mayor frecuencia en rodajas que parecieron soportar peor la manipulación experimental. Por otra parte las células insensibles a la hipoxia tienen corrientes iónicas normales y una maquinaria secretora

normal. Como se ha descrito previamente (López-Barneo y cols., 1998), la respuesta a hipoxia depende de mecanismos sensibles y lábiles que pueden alterarse sin daño aparente que afecte a las corrientes iónicas o a la actividad secretora celular.

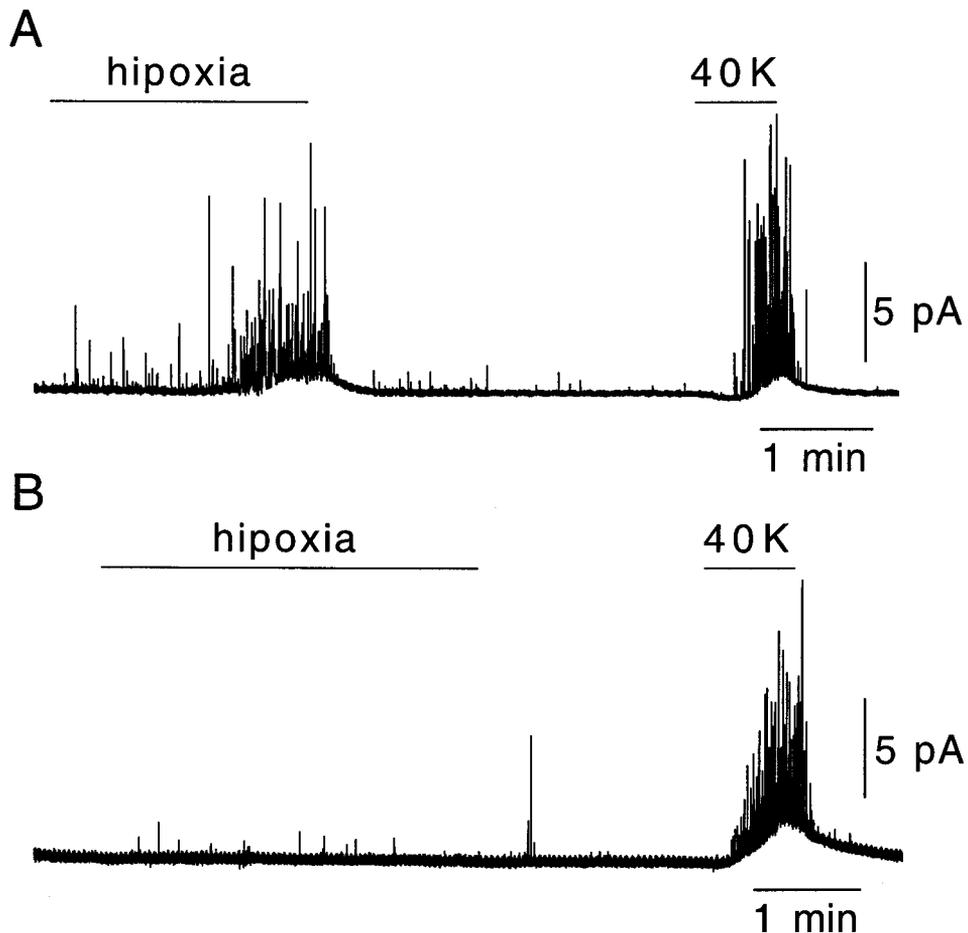


Figura 29. Respuesta secretora de dos células glómicas de distintas rodajas a los mismos estímulos hipoxia y alto potasio.

2. 3. Dependencia de la respuesta quimiorreceptora de calcio extracelular

Para estudiar la dependencia de calcio extracelular de la respuesta a hipoxia se añadió a la célula glómica una solución externa que contenía 200 μM de cloruro de cadmio. El ión cadmio (Cd^{2+}) es un potente inhibidor de los canales de calcio voltaje dependientes. En la figura 30A se muestra un registro amperométrico representativo de este tipo de experimentos. Se observa cómo en presencia del cadmio se bloquea

totalmente la respuesta secretora a la hipoxia, que se recupera una vez lavado el bloqueante. Este mismo bloqueo ocurre si se aplica una solución externa sin calcio y con 1 mM EGTA como agente quelante (Fig. 30B). Estos resultados coinciden con lo descrito por nuestro grupo en células glómicas dispersas de conejo (Ureña y cols., 1994).

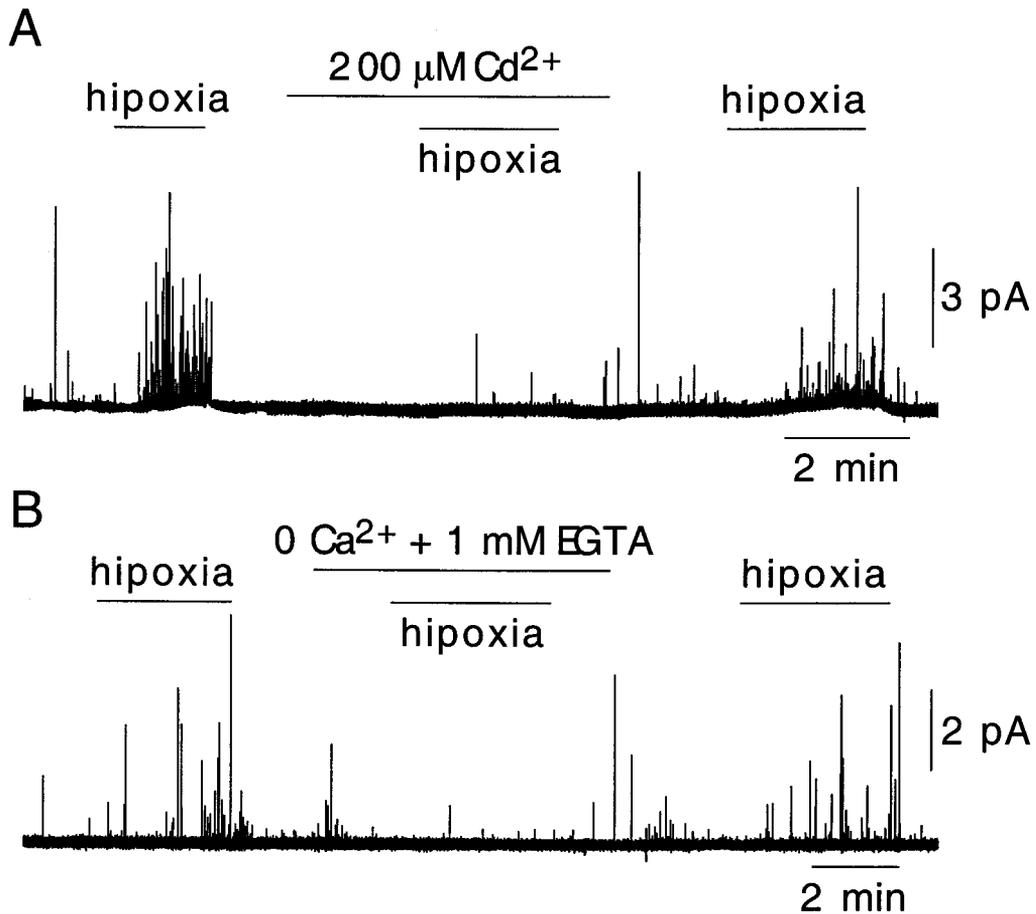


Figura 30. Respuesta secretora de dos células glómicas de dos rodajas a los distintos estímulos indicados en las barras horizontales.

3. Efecto del bloqueo farmacológico de canales de potasio en las células glómicas

Como se indicó en "Introducción", uno de los objetivos principales del estudio del mecanismo de quimiotransducción fue comprobar la importancia de los canales de potasio voltaje-dependientes como efectores de la respuesta a hipoxia. Si la disminución de la pO_2 despolariza a las células glómicas mediante la inhibición de canales de potasio voltaje-

dependientes, entonces la aplicación de bloqueantes de estos mismos canales debería tener un efecto similar al de la hipoxia. Como se mostró en el apartado 1.1 de este capítulo, las corrientes iónicas de salida registradas en las células glómicas de rata son debidas mayoritariamente a canales de potasio voltaje-dependientes y canales de potasio calcio-dependientes. Ambos tipos de canales son muy sensibles al bloqueo por tetraetilamonio (TEA), por tanto este agente debería inducir la despolarización de las células glómicas, entrada de calcio extracelular y aumento de la secreción.

3. 1. Efecto del TEA sobre las corrientes de potasio

Para comprobar la accesibilidad del TEA a las células glómicas en las rodajas se aplicó en la solución externa a una concentración final de 5 mM.

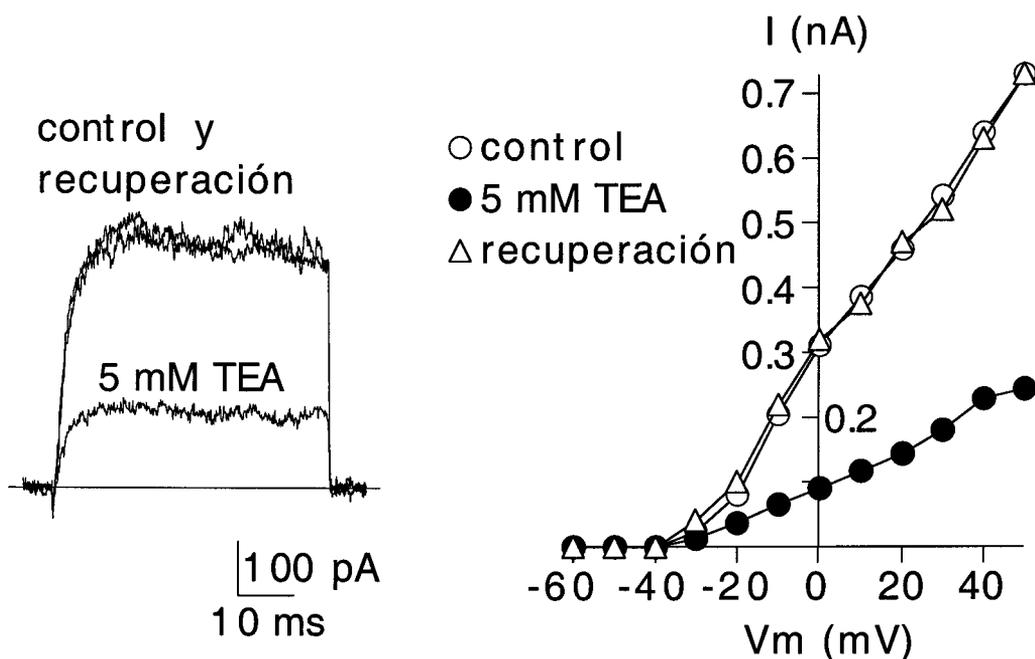


Figura 31. Corrientes de potasio generadas en una célula glómica en respuesta a pulsos de voltaje de 100 mV de amplitud desde el potencial de membrana, en ausencia, presencia y lavado de 5 mM TEA. A la derecha se muestra la curva corriente/voltaje en esta misma célula y en idénticas condiciones experimentales. La corriente se midió en su punto máximo a cada voltaje.

En la figura 31 se muestran las corrientes generadas en una célula glómica registrada en la configuración de *whole-cell* en respuesta a pulsos

despolarizantes desde el potencial de membrana hasta +20 mV. Se observa cómo el TEA bloquea reversiblemente las corrientes de potasio de esta célula en casi un 70% al voltaje aplicado. En el panel de la derecha se muestra la correspondiente curva corriente/voltaje en las tres condiciones experimentales descritas (control, presencia de 5 mM TEA y lavado o recuperación). El bloqueo de las corrientes tiene lugar a todos los voltajes en los que hay activación de los canales. Este experimento se repitió en cuatro células glómicas de diferentes rodajas, dando en todas ellas un resultado muy similar. Por lo tanto no parece que la organización histológica de las rodajas dificulte la accesibilidad a las células de moléculas, como el TEA, disueltas en la solución externa. Nuestras observaciones corroboran además el efecto bloqueante del TEA sobre las corrientes de potasio en células glómicas de rata (Peers y O'Donnell, 1990).

3. 2. Efecto del TEA sobre la actividad secretora celular

La aplicación de 5 mM TEA a una célula glómica indujo un aumento en su actividad secretora muy similar al inducido por la hipoxia (Fig. 32A). El aumento de la frecuencia de eventos secretores inducido por TEA se mantiene durante toda la exposición al bloqueante, y es rápidamente reversible tras el lavado. La mayor parte de las células glómicas estudiadas (31 de 32) respondieron de forma similar al TEA, aumentando su secreción hasta un nivel máximo medido en el minuto tras 90 segundos de exposición al bloqueante de 42 ± 17 espigas por minuto ($n=6$ células). Este valor no es significativamente diferente al obtenido con las respuestas a hipoxia (test t-Student, $\alpha>0.05$), lo que sugiere que, en cuanto a intensidad del estímulo, la hipoxia y la aplicación de TEA son muy similares.

Para detectar posibles diferencias entre las vesículas liberadas en respuesta a la hipoxia y las secretadas por la aplicación de TEA, se estudió el valor medio y la distribución de los valores de *carga* en ambas

Además de en la solución estándar de 4.7 mM potasio extracelular, el efecto del TEA se estudió en células bañadas con soluciones externas que solo contenían 2.7 mM potasio. La figura 33 muestra que en estas condiciones, posiblemente más cercanas a las fisiológicas, el TEA también produce secreción de forma reversible.

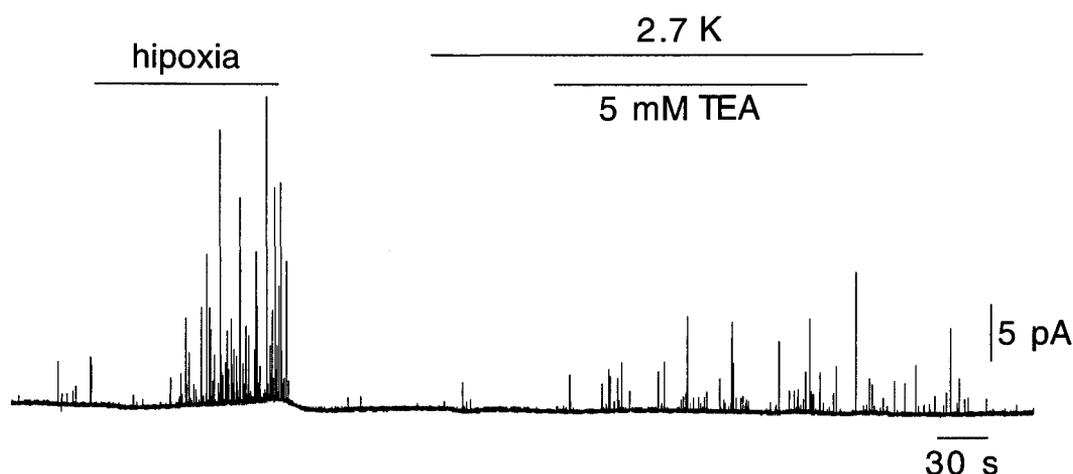


Figura 33. Respuesta secretora de una célula glómicica a la aplicación de TEA en presencia de una solución externa con solo 2.7 mM K^+ .

3. 3. Efecto del TEA sobre células insensibles a hipoxia

Dado que el bloqueo de canales de potasio por TEA produce secreción en las células de las rodajas, se estudió si este tratamiento también activa a células glómicicas insensibles a la hipoxia, que, en principio, tienen canales iónicos y maquinaria secretora normales. En estas células la despolarización producida por el TEA debe dar lugar a la entrada de calcio extracelular y a la secreción. El proceso de excitación celular no tiene que estar afectado por la presencia o no de un sistema sensor de oxígeno. El experimento para comprobarlo se llevó a cabo en cuatro células glómicicas insensibles a hipoxia, con resultados muy similares en todos los casos al mostrado en el ejemplo de la figura 34. Se observa claramente el efecto del TEA aunque esta célula glómicica parece tener una capacidad secretora algo mermada, según se desprende de la respuesta relativamente débil a 40 mM K^+ . Este resultado sugiere que

efectivamente las células que denominamos insensibles a hipoxia tienen canales voltaje-dependientes y una maquinaria secretora normales, pero por alguna razón desconocida el sistema sensor de oxígeno se ha inactivado o desacoplado de los canales de potasio.

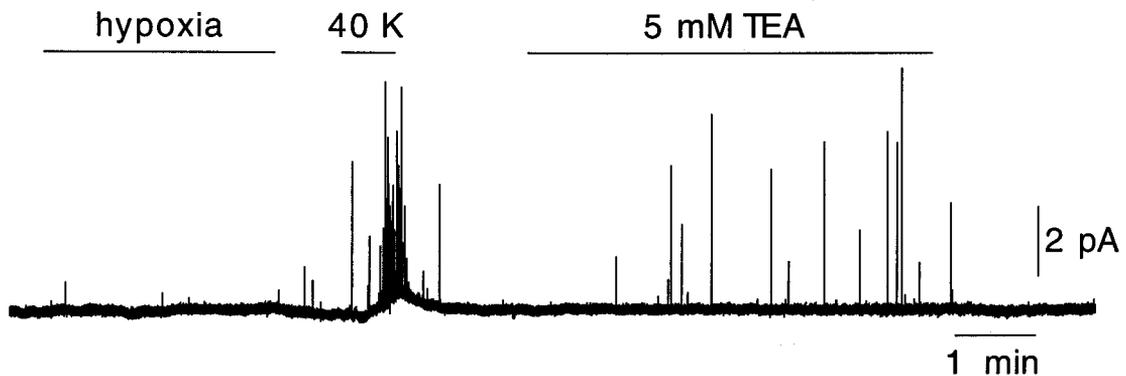


Figura 34. Respuesta secretora de una célula glomerular insensible a hipoxia, a estímulos despolarizantes como el alto potasio o el TEA.

3. 4. Potenciación del efecto de la hipoxia por TEA

Los datos mostrados en los apartados anteriores indican que la hipoxia y el TEA actúan de igual forma sobre la célula glomerular, inhibiendo canales de potasio voltaje-dependientes. Por tanto, la exposición simultánea a ambos estímulos debe dar lugar a mayor inhibición de los canales de potasio, mayor entrada de calcio y a ráfagas de secreción más acentuadas.

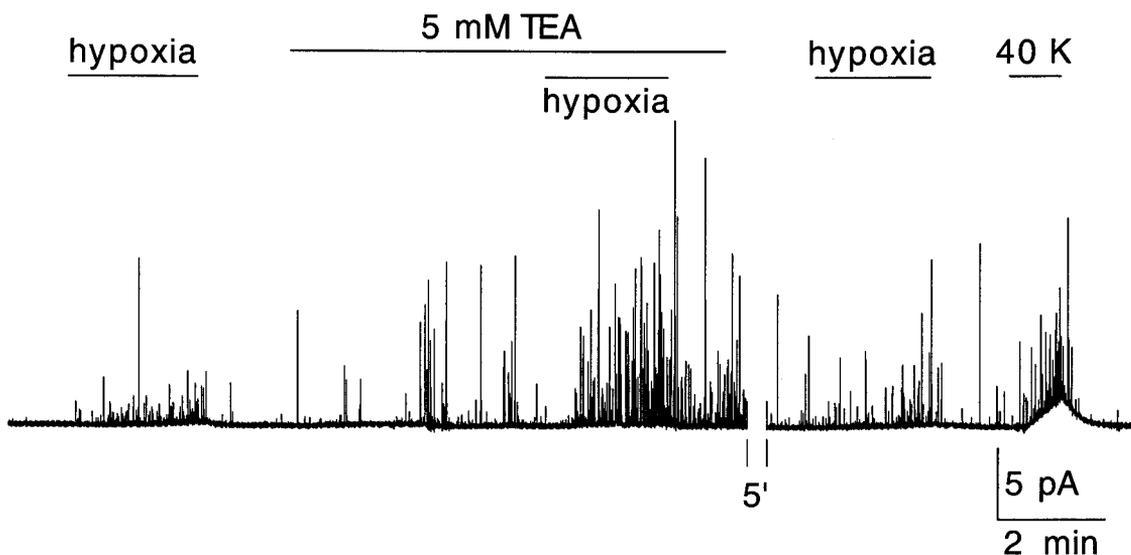


Figura 35. Respuesta secretora de una célula glomerular en una rodaja ilustrando la potenciación del efecto de la hipoxia por parte del TEA.

En la figura 35 se muestra un experimento representativo de doble exposición a hipoxia y TEA sobre una célula glómica en una rodaja. Se observa cómo la hipoxia incrementa la frecuencia de secreción de vesículas de forma mucho más eficaz en presencia del bloqueante. Existe un efecto sumatorio, como cabría esperar al actuar ambos estímulos inhibiendo a los canales de potasio.

3. 5. Efecto de la iberiotoxina

Ya que en las células glómicas de rata el canal sensible a oxígeno descrito es el canal de potasio dependiente de calcio (Peers, 1990), se estudió el efecto de la aplicación de iberiotoxina (IbTX) pues es un bloqueante más específico que el TEA y es activo en el rango nanomolar (Gálvez y cols., 1990). La aplicación a la solución externa de 200 nM IbTX indujo en las tres células estudiadas un incremento en la frecuencia de eventos secretores muy similar al inducido por la hipoxia (Fig. 36).

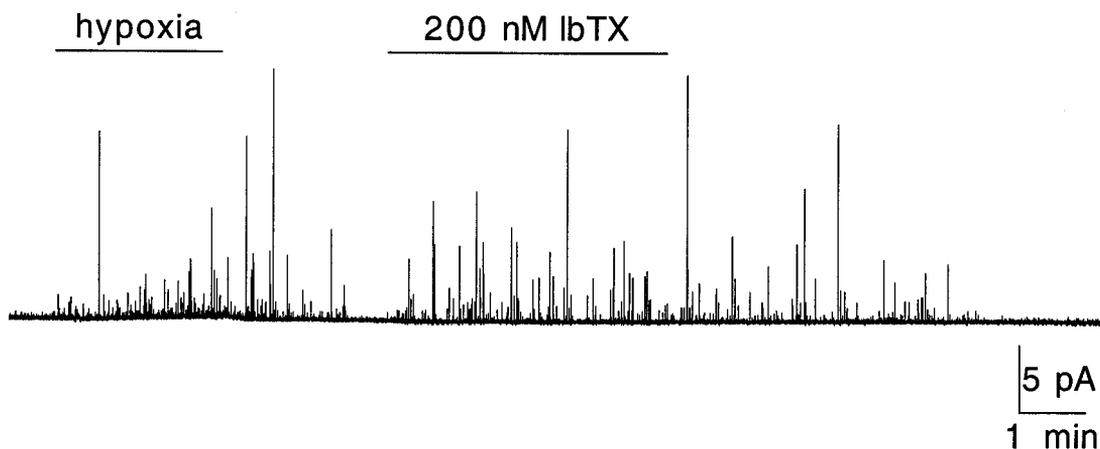


Figura 36. Respuesta secretora de una célula glómica a la aplicación en la solución externa de 200 nM IbTX.

Por tanto los resultados con los bloqueantes indican, como postula la hipótesis de la membrana en el cuerpo carotídeo de rata, que la hipoxia podría estar induciendo despolarización y secreción en las células glómicas mediante la inhibición de canales de potasio, y más concretamente los canales de potasio dependientes de calcio o K_{Ca} .

4. Papel de la mitocondria en el proceso quimiotransductor del cuerpo carotídeo

En este capítulo se utilizó la nueva preparación de rodajas de cuerpo carotídeo para determinar si algún elemento estructural en la mitocondria podría estar implicado en el sistema quimiotransductor de la pO_2 del cuerpo carotídeo. Varios autores han considerado a la mitocondria como elemento sensor de oxígeno no solo en el cuerpo carotídeo sino también en otras células neurosecretoras (Duchen y Biscoe, 1992a; Mojet y cols., 1997; Inoue y cols., 1998). La mayoría de estos trabajos concluyen que el efecto de los inhibidores potentes de la cadena respiratoria de la mitocondria es similar al estímulo hipóxico fisiológico. En el presente trabajo se realiza un estudio acerca de la acción diferencial de varios inhibidores de la cadena respiratoria sobre la secreción celular, mostrando cómo afecta cada uno de ellos a la respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo.

4. 1. Efecto del cianuro sódico

El cianuro (CN), inhibidor de la citocromo c oxidasa de la cadena de transporte de electrones, es el desacoplante mitocondrial clásicamente utilizado como agente productor de la llamada hipoxia histotóxica (Mills y Jöbsis, 1972; Biscoe y Duchen, 1989). Sin embargo en estos trabajos se muestra cómo el efecto del CN es siempre más equiparable a estímulos drásticos como la anoxia, que a cambios moderados de la pO_2 .

La aplicación de 2 mM cianuro sódico (concentración en el rango de la utilizada por otros autores para producir hipoxia histotóxica) a la solución externa que baña a las células glómicas en las rodajas genera respuestas secretoras vigorosas similares a la mostrada en la figura 37A. El incremento de la frecuencia de secreción vesicular inducido por el inhibidor mitocondrial es tan fuerte que la célula queda dañada o totalmente depletada de vesículas liberables. La célula es incapaz de responder a cualquier estímulo posterior incluso tras varios minutos de

lavado del CN. En todas las células glómicas estudiadas (n=6) el CN estimuló de manera mucho más drástica que la propia hipoxia fisiológica.

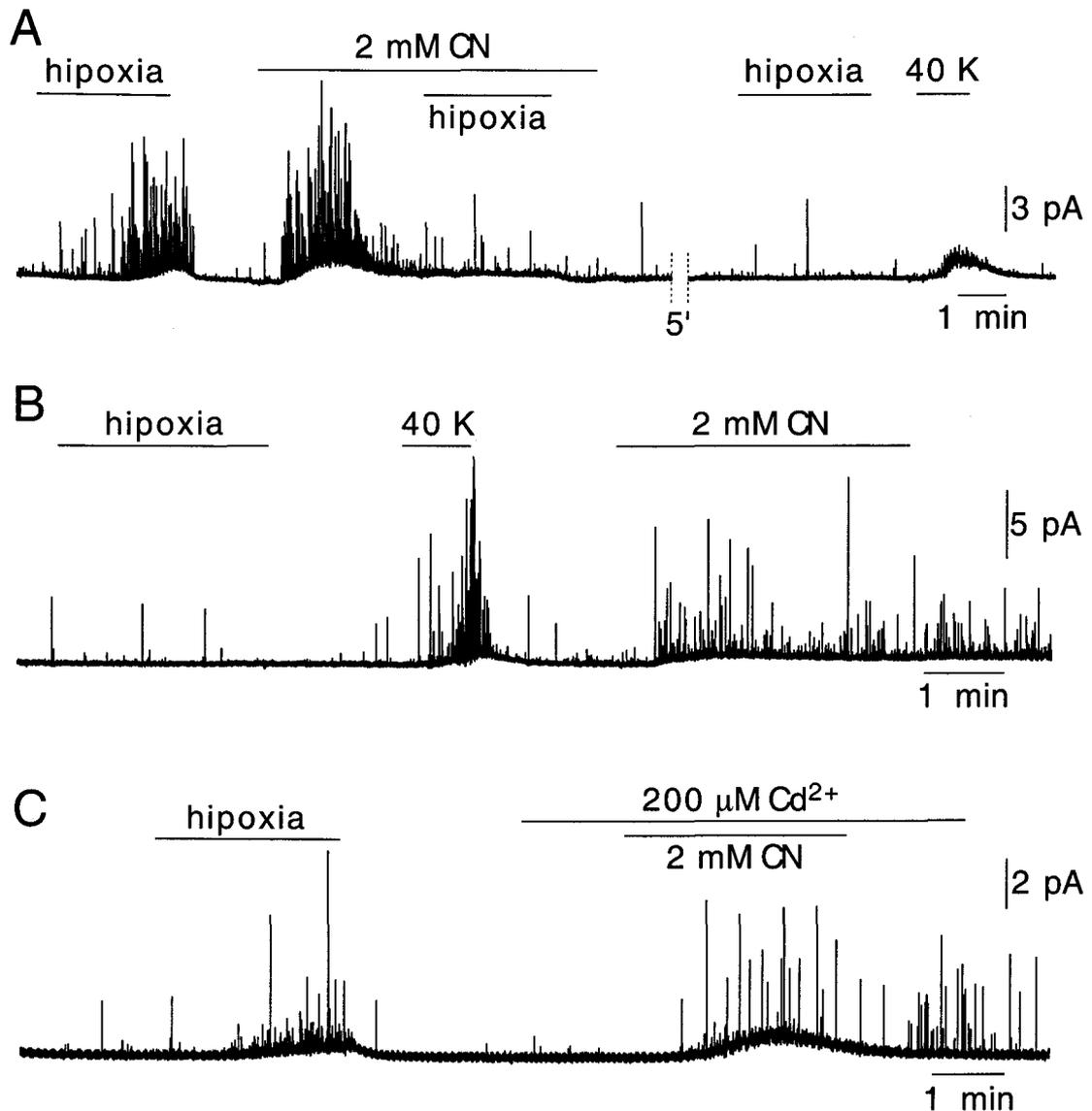


Figura 37. Respuestas secretoras de tres células glómicas de distintas rodajas a los estímulos indicados sobre las barras horizontales.

Un dato adicional que indica la independencia entre ambos estímulos, hipoxia y CN, es que la aplicación del desacoplante mitocondrial a células glómicas insensibles a hipoxia produce la misma respuesta secretora (Fig. 37B; ejemplo de n=4 células). Las células glómicas por tanto son capaces de responder a un estímulo potente como el cianuro aun sin tener un sensor funcional de oxígeno. La aplicación de CN en

presencia de cadmio bloqueando los canales de calcio pone de manifiesto la dependencia solo parcial de calcio extracelular de la actividad secretora inducida por el desacoplante mitocondrial (Fig. 37C). Este resultado contrasta con la dependencia total de calcio extracelular que demostró tener el proceso de secreción en respuesta a hipoxia (ver Fig. 30). Nuestros datos muestran que en el cuerpo carotídeo el efecto del CN (hipoxia histotóxica) es claramente diferente de la hipoxia fisiológica.

4. 2. Efecto de los protonóforos

Además del cianuro, en diferentes estudios se han utilizado desacoplantes mitocondriales del tipo de los protonóforos asemejándolos también a la hipoxia fisiológica (ver, por ejemplo, Buckler y Vaughan-Jones, 1998). Estos inhibidores transportan de forma inespecífica a los protones a través de la membrana interna mitocondrial, destruyendo así el gradiente de protones y por tanto el funcionamiento general de todo el orgánulo (síntesis de ATP, homeostasis del calcio, etc). Existen distintos desacoplantes mitocondriales de este tipo, siendo los más utilizados el FCCP y el CCCP.

En la figura 38 se muestra el efecto de la aplicación de 2.5 μ M CCCP disuelto en solución externa sobre una célula glómica en una rodaja (ejemplo de n=5 células). En este experimento también se usó cadmio, bloqueante de canales de calcio voltaje-dependientes, para estudiar la dependencia de calcio extracelular del efecto de la aplicación de CCCP. El protonóforo produjo un fuerte incremento en la frecuencia de eventos secretores, aun en presencia del bloqueante de los canales de calcio. No obstante, la secreción inducida por CCCP tiene una dependencia parcial del calcio extracelular pues, al retirar el cadmio se incrementó aún más la liberación de catecolaminas. Tras la estimulación con CCCP las células quedaron dañadas o depletadas de vesículas liberables, sin poder responder a la hipoxia en posteriores exposiciones. El efecto del

protonóforo CCCP sobre el cuerpo carotídeo es por tanto muy similar al del cianuro, siendo en ambos casos el efecto muy distinto del que tienen sobre estas células los valores fisiológicos de hipoxia.

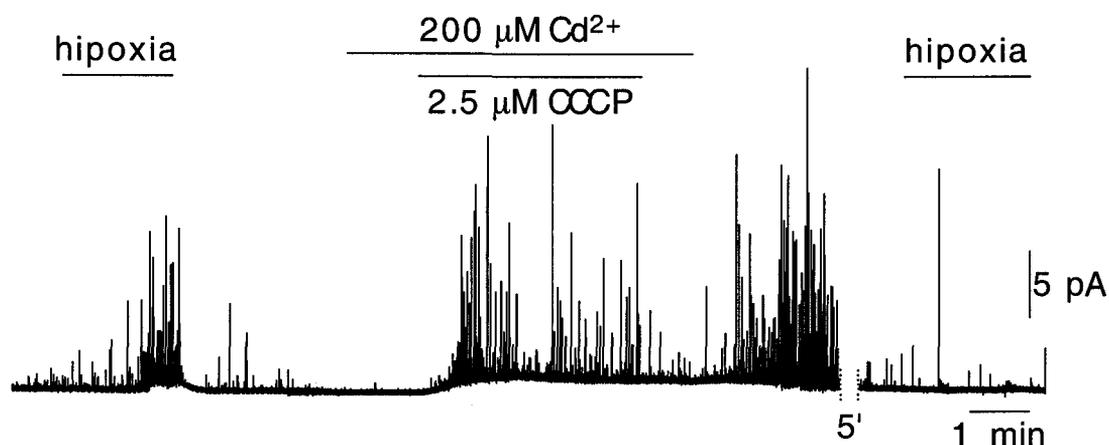


Figura 38. Respuesta secretora de una célula glómica a la aplicación en la solución externa del protonóforo CCCP, en presencia de cadmio como bloqueante de canales de calcio.

4. 3. Efecto de la rotenona

Para progresar en el análisis del posible papel de la mitocondria en el mecanismo quimiotransductor se realizaron experimentos con inhibidores proximales de la cadena respiratoria, que son estímulos menos potentes y no destruyen rápidamente la capacidad secretora de las células glómicas. Se utilizaron rotenona y antimicina A, inhibidores respectivamente de los complejos mitocondriales I y III.

En la figura 39A se muestra el efecto de la aplicación de 5 μM rotenona a la solución externa en un experimento de registro de la secreción celular. La célula glómica sensible a hipoxia incrementa también su frecuencia de secreción de vesículas en respuesta a la presencia de rotenona, en la mayoría de los casos de forma irreversible (ejemplo de n=19 células). Esta estimulación por el inhibidor mitocondrial es totalmente dependiente de calcio extracelular, ya que segundos después de la aplicación de cadmio desaparecen completa y reversiblemente los eventos de secreción. La frecuencia de eventos secretores en respuesta a rotenona,

medida en el minuto tras 90 s de exposición al inhibidor fue de 47 ± 23 eventos por minuto ($n=7$ células). Este valor no es significativamente diferente al obtenido con baja pO_2 (test t-Student, $\alpha>0.05$), lo que sugiere que la hipoxia y la rotenona son estímulos muy similares.

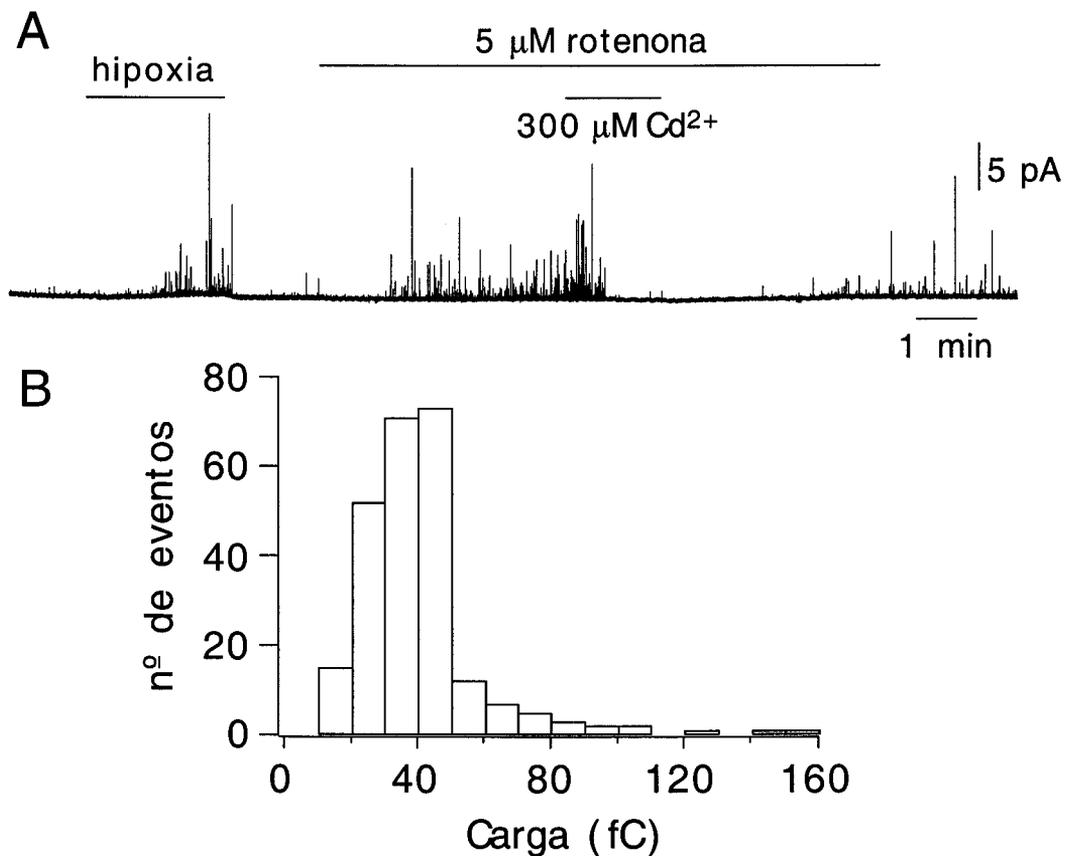


Figura 39. A. Respuesta secretora de una célula glómica a la aplicación de 5 μM rotenona, y dependencia de calcio externo. B. Histograma de frecuencias de la variable *carga* medida en 245 eventos inducidos por rotenona en 5 células.

En la figura 39B se muestra un histograma de frecuencias de los valores de *carga* de eventos inducidos por rotenona, variable cuyo valor medio fue 40 ± 18 fC ($n=245$ espigas en 5 células). De nuevo, este valor es muy similar al obtenido con eventos inducidos por hipoxia (t-Student, $\alpha>0.05$), indicando que ambos estímulos liberan el mismo tipo de vesículas catecolaminérgicas.

La similitud entre el estímulo hipóxico y la rotenona se puso aún más de manifiesto al comprobar que todas las células glómicas insensibles

a hipoxia a las que se les añadió rotenona fueron también insensibles al inhibidor mitocondrial. Un registro de la actividad secretora de una de las 6 células insensibles a hipoxia estudiadas se muestra en la figura 40A. Este tipo de células son despolarizables por alto potasio pero no responden ni a hipoxia ni a la aplicación de rotenona, sugiriendo que ambos estímulos actúan a través de la misma vía.

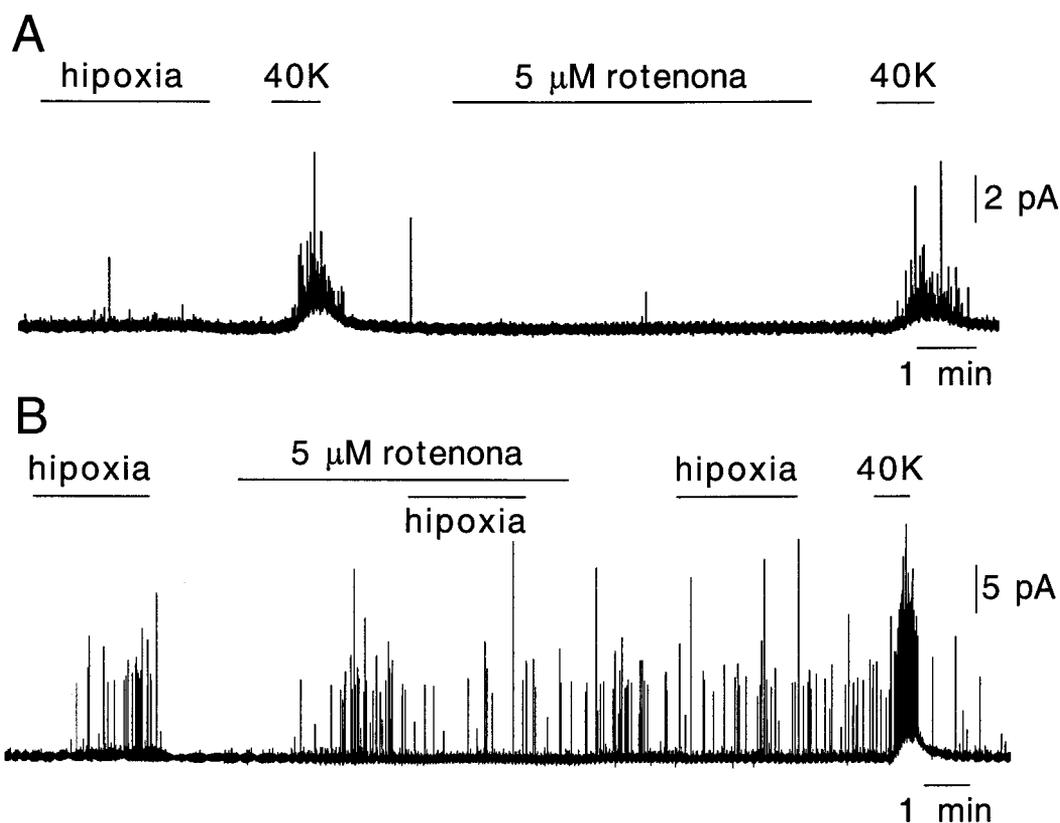


Figura 40. A. Respuesta secretora de una célula glómicula insensible a hipoxia a la aplicación de 5 μM rotenona. B. Respuesta secretora de una célula glómicula de otra rodaja al doble estímulo, hipoxia y rotenona.

Por otro lado los efectos de hipoxia y rotenona son excluyentes, es decir, una vez que se aplica rotenona, la célula no responde a la hipoxia (Fig. 40B), ni en presencia del inhibidor mitocondrial, ni tras el lavado de éste, pues el efecto de la rotenona es generalmente irreversible. La frecuencia de secreción de vesículas obtenida en el minuto tras 90 s de doble estímulo fue de 38 ± 20 espigas por minuto ($n=5$ células), valor muy similar al obtenido con cualquiera de los dos estímulos por separado (t-

La aplicación de 1 mg/l de antimicina A a la solución externa genera en las células glómicas un aumento en la frecuencia de secreción de vesículas como el que se ilustra con el ejemplo de la figura 41A (n=11). Se observa también en ese mismo registro que el efecto de la antimicina A depende de calcio extracelular. La frecuencia media de eventos secretores medida tras 90 s de exposición al inhibidor fue de 49 ± 12 espigas por minuto (n=11 células), también muy similar a lo obtenido con la hipoxia (t-Student, $\alpha > 0.05$). En la figura 41B se muestra el histograma de frecuencias de los valores de *carga* para eventos inducidos por antimicina A. Esta distribución posee un valor medio de 40 ± 22 fC (n=132 espigas en 5 células), que tampoco resulta significativamente diferente al valor obtenido con eventos inducidos por hipoxia (test t-Student, $\alpha > 0.05$).

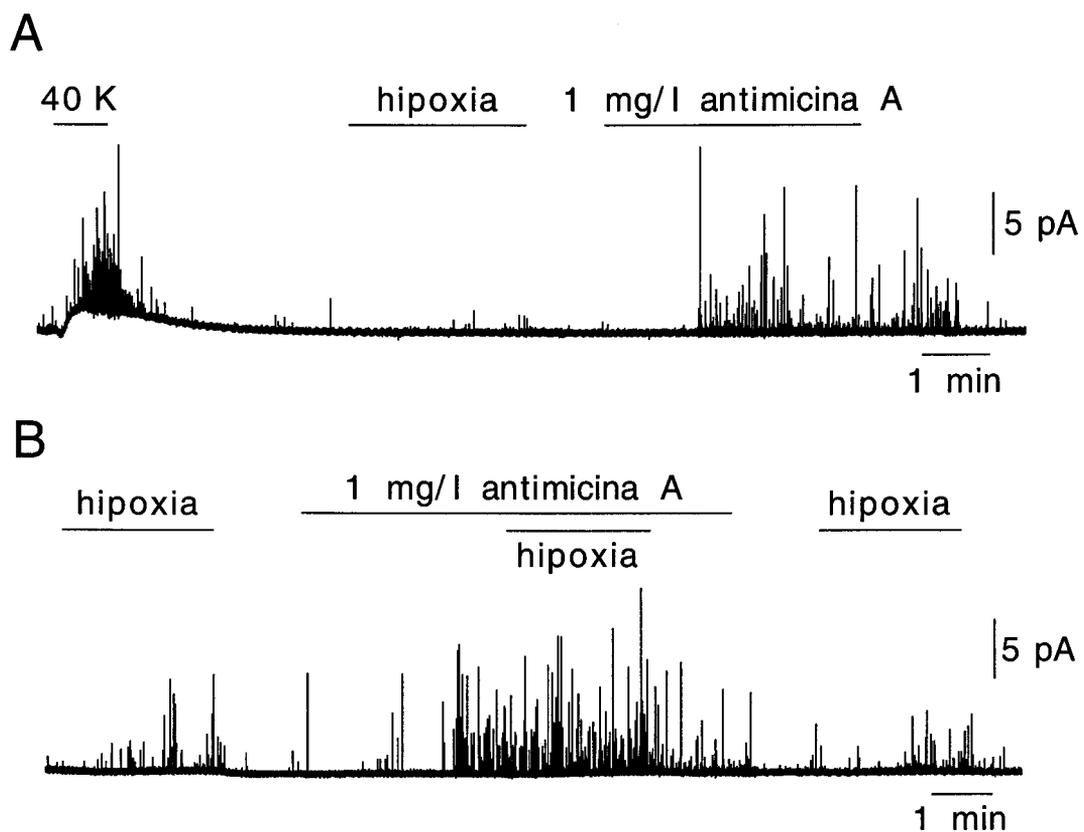


Figura 42. A. Respuesta secretora de una célula glómica insensible a hipoxia a la aplicación de 1 mg/l de antimicina A. B. Respuesta secretora de una célula glómica de otra rodaja al doble estímulo, hipoxia y antimicina A.

En principio la hipoxia y la antimicina A parecen también estímulos muy similares que activan a la misma población de vesículas. Sin embargo se estudiaron tres células insensibles a hipoxia, y las tres respondieron perfectamente a la estimulación mediante aplicación de antimicina A (Fig. 42A). Además, como puede observarse en la figura 42B, ambos estímulos se potencian, con una frecuencia media de secreción conjunta de 95 ± 14 eventos por minuto ($n=5$ células). Este valor resulta significativamente superior al obtenido con cualquiera de los dos estímulos por separado (test t-Student, $\alpha=0.001$). Por lo tanto parece claro que aunque parecidos, la hipoxia y la antimicina A son estímulos con distintos mecanismos de acción, y además, al contrario que la rotenona, la antimicina A no bloquea el efecto posterior de la hipoxia.

4. 5. Efecto del doble estímulo, rotenona y antimicina A

Si el estímulo hipóxico se asemeja al efecto de la rotenona y es distinto del de la antimicina A, la aplicación de rotenona en presencia de antimicina A debería potenciar la actividad secretora tal y como hace la hipoxia. En la figura 43A se muestra un registro obtenido de una de las 5 células en las que se realizó este tipo de experimento. Efectivamente, la presencia de rotenona potencia el efecto que ejerce la aplicación de antimicina A, llegando a una frecuencia media de secreción, medida en el minuto tras 90 s de doble estímulo, de 93 ± 10 espigas por minuto ($n=5$ células). Este valor es significativamente superior al obtenido con cualquiera de los dos estímulos por separado (test t-Student, $\alpha=0.001$), y sin embargo muy similar al obtenido con el doble estímulo, hipoxia mas antimicina A (test t-Student, $\alpha>0.05$).

En la figura 43B se resume mediante un diagrama de barras los efectos estimulantes sobre la frecuencia de eventos secretores que tuvieron la hipoxia, la rotenona y la antimicina A. Se aprecia claramente la similitud

entre los estímulos hipoxia y rotenona, y las diferencias entre ambos y la antimicina A.

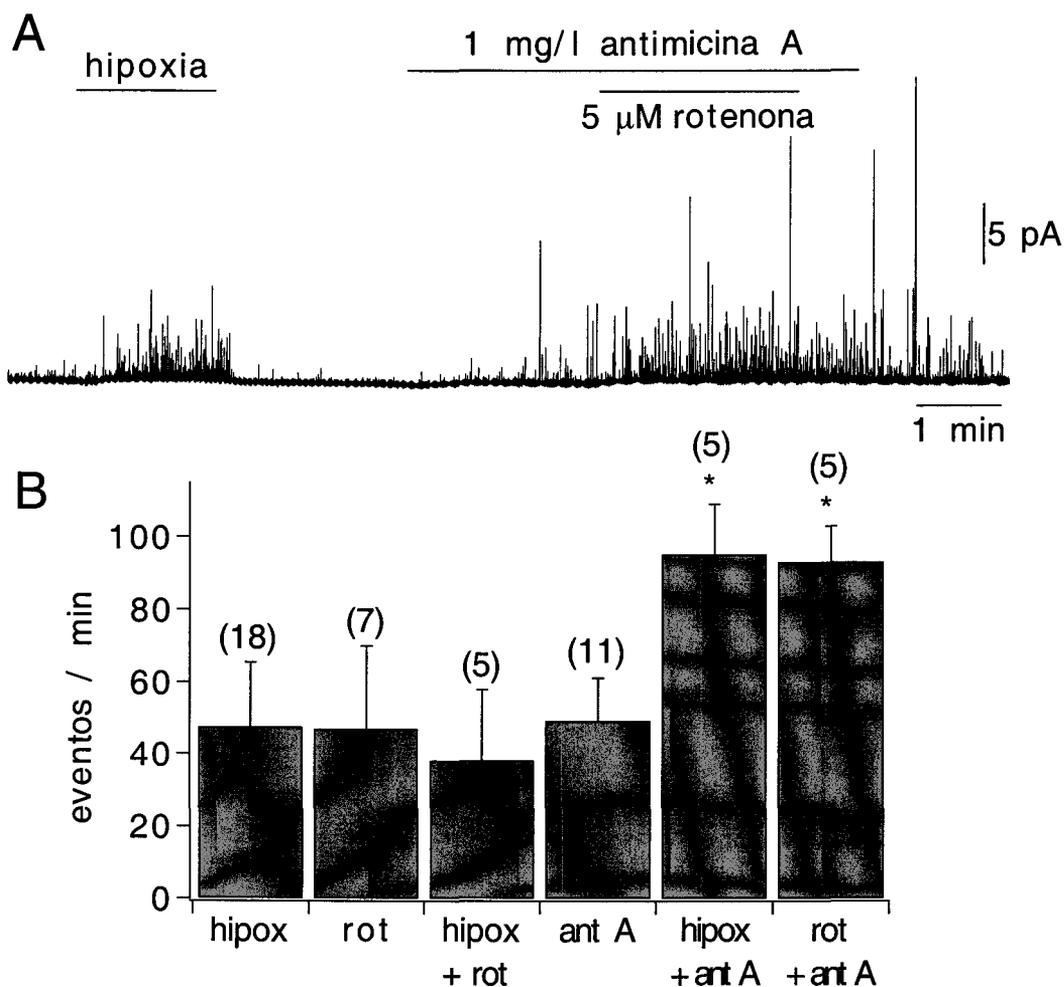


Figura 43. A. Respuesta secretora de una célula glómica al doble estímulo, 1 mg/l antimicina A y 5 μ M rotenona. B. Diagrama de barras representando las distintas frecuencias de secreción obtenidas con la hipoxia y los dos inhibidores proximales. Entre paréntesis se muestran el número de células, y los asteriscos señalan los valores significativamente diferentes comparados a los controles (t-Student, $\alpha=0.001$).

4. 6. Efecto de la rotenona sobre las corrientes de potasio

Tras la caracterización de los efectos de los inhibidores mitocondriales sobre la actividad secretora de células glómicas en las rodajas, se inició un análisis de la acción de estos inhibidores sobre las corrientes de potasio. En esta memoria se resumen solamente datos preliminares sobre la acción de la rotenona.

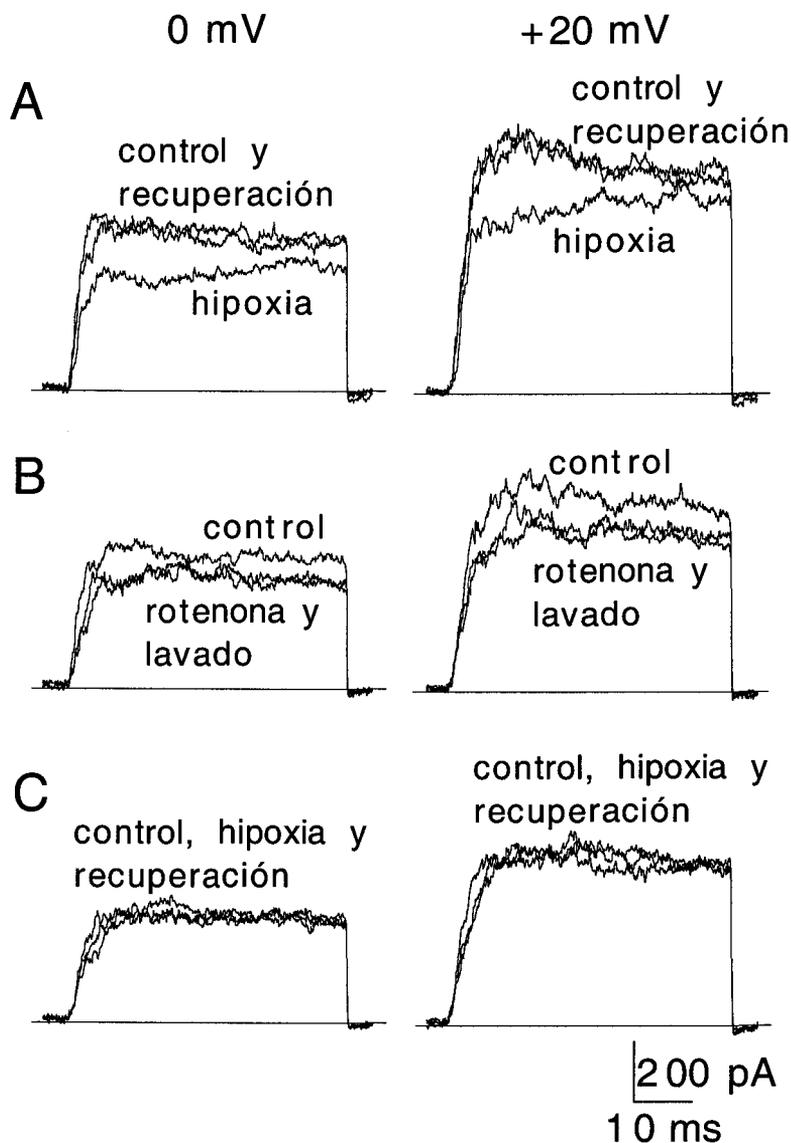


Figura 44. Corrientes voltaje-dependientes de potasio de una célula glómicula en respuesta a pulsos despolarizantes desde el potencial de membrana hasta 0 mV (izquierda) o + 20 mV (derecha). A. Efecto de la hipoxia sobre las corrientes. B. Efecto de la aplicación de 5 μ M rotenona a la solución externa. C. Efecto de la hipoxia tras la aplicación del inhibidor mitocondrial.

El efecto de la aplicación de rotenona sobre las corrientes de potasio en una célula registrada en la configuración *whole-cell* se ilustra en la figura 44. En el panel A se muestra el efecto de la solución hipóxica sobre las corrientes de esta célula, es decir, la inhibición reversible de las corrientes de potasio voltaje-dependientes en respuesta al descenso en la pO_2 . En el panel B se ilustra el efecto que a continuación tuvo la aplicación de 5 μ M rotenona sobre las corrientes. Se observa cómo, al igual que la hipoxia, la

rotenona inhibió las corrientes de potasio, aunque de forma irreversible. Además en el panel C se muestra una exposición a hipoxia posterior al efecto de la rotenona, ilustrando cómo las corrientes de potasio dejan de ser sensibles a la hipoxia. El comportamiento de las corrientes de potasio de esta célula frente a rotenona e hipoxia se corresponde con lo obtenido en el estudio de la secreción celular. Estos datos preliminares sugieren que la rotenona podría estar activando a las células glómicas mediante el mismo mecanismo que la hipoxia, y al hacerlo de forma irreversible impediría que el sistema sensor de oxígeno permaneciese funcional.

5. Estudio del efecto de la hipoglucemia sobre el cuerpo carotídeo

Una observación de especial importancia en el presente trabajo y que podría resultar la más novedosa ha sido el descubrimiento del posible papel glucosensor de las células glómicas. El conocimiento de esta nueva propiedad quimiorreceptora confirmaría aún más al cuerpo carotídeo como órgano vigilante de la disponibilidad de los sustratos básicos (oxígeno y glucosa) para la supervivencia de las células del SNC y en general de todo el organismo. La activación del cuerpo carotídeo por falta de alguno o los dos sustratos esenciales (isquemia) alertaría al SNC que pondría en marcha los mecanismos adaptativos adecuados.

Se ha utilizado la nueva preparación de rodajas finas de cuerpo carotídeo para estudiar el efecto sobre las células glómicas del cambio de la solución externa normoglucémica (ver "Materiales y Métodos") por otra solución en la que la glucosa se sustituyó por 10 mM sacarosa (solución hipoglucémica ó 0 glucosa). Puesto que la sacarosa no es metabolizable, de esta forma se mantiene la osmolaridad de la solución deteniendo el suministro de glucosa a las células glómicas.

5. 1. Efecto de la ausencia de glucosa sobre la secreción celular en rodajas finas de cuerpo carotídeo

Al aplicar la solución hipoglucémica a las células glómicas en las rodajas se observa un aumento significativo y reversible de la frecuencia de eventos secretores, muy similar al obtenido con el descenso de la pO_2 (Fig. 45A). Esta respuesta indica que en esta nueva preparación de cuerpo carotídeo las células glómicas son sensibles tanto a la hipoxia como a la hipoglucemia incrementando su actividad secretora.

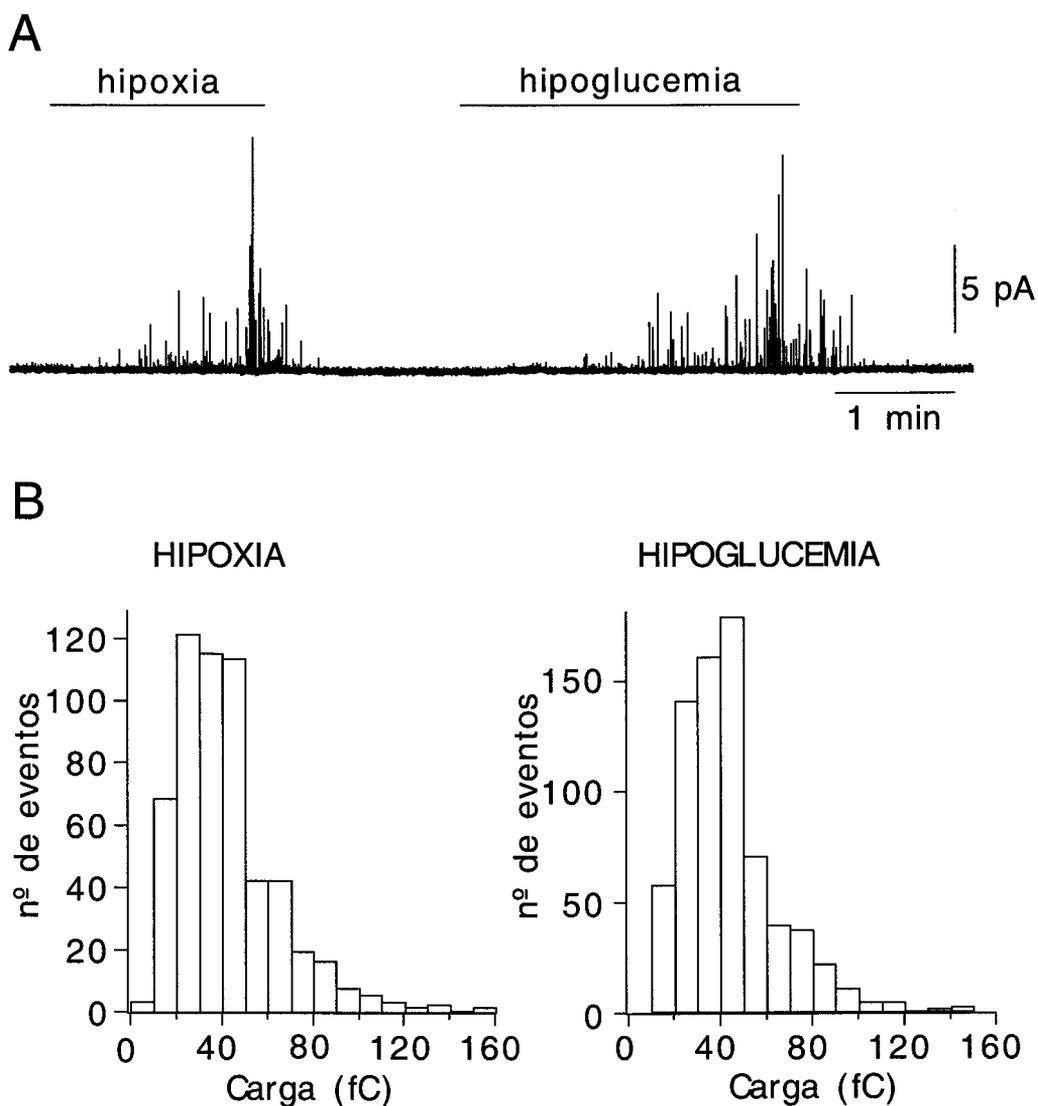


Figura 45. A. Respuesta neurosecretora de una célula glómica en una rodaja a la exposición de una solución externa hipóxica y de una solución externa con 0 glucosa. B. Distribución de los valores de *carga* de eventos inducidos por hipoxia (izquierda) o por hipoglucemia (derecha).

La respuesta a hipoglucemia fue en todos los casos algo más lenta que la respuesta a hipoxia. Si en general las células glómicas necesitan entre 30 a 60 segundos de exposición a hipoxia para que se obtenga un aumento claro de la actividad secretora, en el caso de la hipoglucemia este tiempo es de al menos 60 a 120 segundos (ver Fig. 45A). Sin embargo ambas respuestas son tanto más rápidas cuanto más exposiciones previas se realicen. En cuanto a la intensidad de la respuesta las células glómicas sometidas al estímulo hipoglucémico alcanzan niveles de actividad secretora muy parecidos a los obtenidos con el estímulo hipóxico. La frecuencia máxima de secreción de vesículas medida en el minuto tras dos minutos de exposición a la solución con 0 glucosa fue de 55.3 ± 7.6 espigas por minuto ($n=10$ células). Este valor es comparable a otros valores de frecuencias de eventos secretores obtenidos con distintos estimulantes del cuerpo carotídeo, como por ejemplo la hipoxia o la rotenona (ver apartados 2.2 y 4.3 de esta sección). Este resultado indica que la falta de glucosa activa al cuerpo carotídeo hasta niveles similares a los descritos con los estímulos clásicos utilizados en el estudio de la fisiología de este órgano.

En la figura 45B se muestra la distribución de la *carga* estimada en eventos de secreción inducidos por hipoxia (izquierda) y por hipoglucemia (derecha). El valor medio obtenido en la distribución de los eventos inducidos por hipoglucemia fue de 45 ± 24 fC ($n=742$ espigas en 12 células). Este valor no es significativamente diferente (test t-Student, $\alpha>0.05$) del obtenido para los eventos inducidos por hipoxia (ver apartado 2.2), lo que sugiere que ambos estímulos están activando al mismo tipo de vesículas catecolaminérgicas.

La aplicación de cadmio a la solución externa hipoglucémica que baña a una célula glómica pone de manifiesto que la actividad secretora inducida por falta de glucosa es totalmente dependiente de calcio extracelular (Fig. 46; ejemplo de $n=3$ células). Este hecho sugiere que al igual que ocurre con la estimulación por baja pO_2 , la hipoglucemia produce

apertura de canales de calcio voltaje-dependientes y que la entrada de calcio es el evento que dispara la secreción.

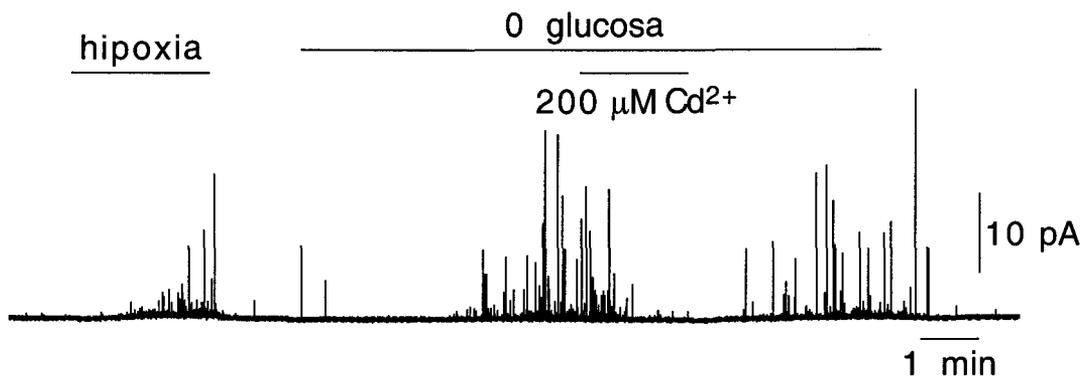


Figura 46. Respuesta secretora de una célula glómica a los estímulos indicados sobre las barras horizontales.

5. 2. El efecto de la hipoglucemia es dosis-dependiente

Para estudiar la sensibilidad del sistema sensor de glucosa del cuerpo carotídeo se analizó el efecto sobre la actividad secretora de las células glómicas de soluciones con distintos grados de hipoglucemia (soluciones con 0, 0.5, 1, 2 y 5 mM glucosa, completando el resto, hasta 10 mM, con sacarosa). Un registro representativo obtenido en una de las tres células glómicas estudiadas, se muestra en la figura 47A. Nótese cómo la frecuencia de eventos secretores es paulatinamente menor cuanto mayor es la concentración de glucosa en la solución externa. La concentración de 5 mM glucosa no indujo una actividad secretora significativamente diferente a la obtenida con la solución control (10 mM glucosa) en ninguna de las células estudiadas. Si se considera la secreción basal en 5 y 10 mM glucosa como 100% de reducción de la actividad máxima obtenida con 0 glucosa, se pueden normalizar los porcentajes de reducción de la respuesta máxima a las distintas concentraciones de glucosa. En la figura 47B se representan los valores promedio obtenidos frente a la concentración del monosacárido. Asumiendo que el proceso dependiese de la simple unión de glucosa por parte de un sensor proteico, el grupo de puntos puede ajustarse a la

ecuación de Michaelis-Menten para reacciones enzimáticas, cuya fórmula sería:

$$Y = \frac{[\text{glucosa}]}{[\text{glucosa}] + K_d}$$

donde Y representaría la actividad del hipotético sensor de glucosa, y K_d la concentración de glucosa a la cual la actividad del sensor es la mitad de la máxima. El ajuste a los datos experimentales resulta en una K_d de 150 μM glucosa; lo que indica que el sensor que hipotéticamente estaría mediando el proceso de detección de la glucosa en el cuerpo carotídeo tiene una afinidad relativamente alta por el azúcar. Estas observaciones indican que en condiciones de normoxia el cuerpo carotídeo se estimula con niveles de glucemia inferiores a 1.5-2 mM glucosa (ver más adelante).

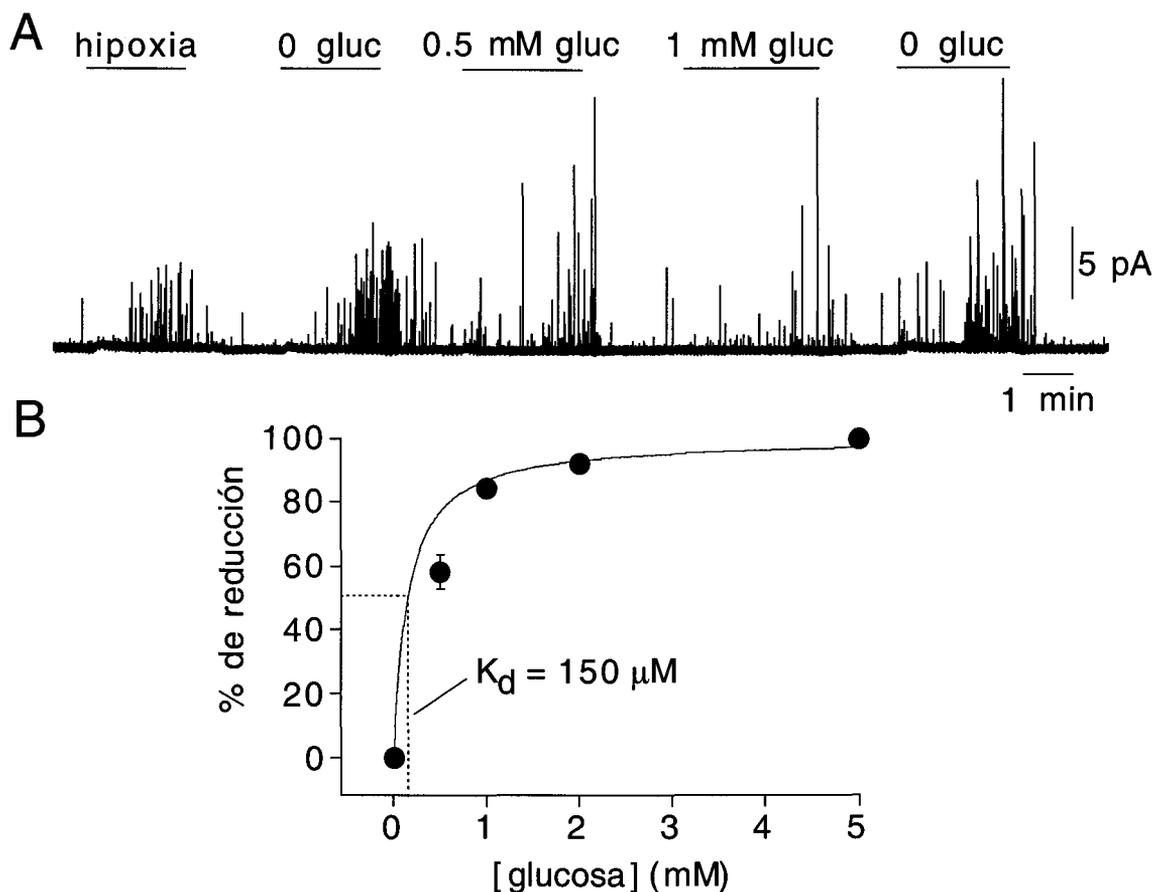


Figura 47. A. Respuesta secretora de una célula glómica a distintos grados de hipoglucemia en la solución externa. B. Representación del porcentaje de reducción de la actividad máxima, frente a la concentración de glucosa, y cálculo de la K_d tras el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten.

5. 3. Relación entre el efecto activador de la hipoglucemia y la metabolización de la glucosa

Uno de los posibles mecanismos involucrados en el funcionamiento como glucosensor del cuerpo carotídeo podría tener relación con el desajuste metabólico causado por la hipoglucemia. La inhibición del metabolismo oxidativo mitocondrial por falta del sustrato esencial, podría provocar la entrada de calcio extracelular y activar la secreción, de forma similar a como actúan los agentes desacoplantes mitocondriales (ver capítulo anterior). Para contrastar esta hipótesis se estudiaron células glómicas expuestas a una solución externa hipoglucémica (0 glucosa) que llevaba además 10 mM piruvato sódico para garantizar el funcionamiento del metabolismo oxidativo y la producción de ATP. En la figura 48A se muestra un registro obtenido en una de las tres células estudiadas, resultado muy similar al observado en las otras dos. La solución con 0 glucosa y 10 mM piruvato induce un aumento en la frecuencia de eventos secretores totalmente comparable al producido por la solución hipoglucémica estándar. Al ser el piruvato muy permeable a través de sus transportadores específicos y fuente rápida de producción de ATP en la mitocondria (Obeso y cols., 1986), este resultado sugiere que el proceso de activación del cuerpo carotídeo por hipoglucemia no depende del desajuste metabólico en la mitocondria, y que ni el ATP ni ningún otro derivado del metabolismo mitocondrial actúan de intermediarios en el proceso (ver más adelante).

Otra posibilidad es que fuese la propia molécula de glucosa la que ejerce la acción inhibidora sobre la célula glómica, sin necesidad de ser metabolizada. Para estudiar este punto utilizamos la 2-desoxi-glucosa, un análogo no metabolizable de la glucosa pero estructuralmente muy similar. Se estudió la aplicación a 4 células glómicas de una solución externa hipoglucémica con 10 mM 2-desoxi-glucosa sustituyendo a la sacarosa. El resultado en una de esas cuatro células se muestra en la figura 48B. Las

otras tres células respondieron de igual modo, incrementando su actividad secretora al exponerlas a la solución externa sin glucosa y con 2-desoxi-glucosa. Estos resultados sugieren que no es la propia molécula de glucosa la que de forma directa modifica la excitabilidad celular y la actividad secretora, y que productos derivados de la glucosa son necesarios para inhibir la secreción celular.

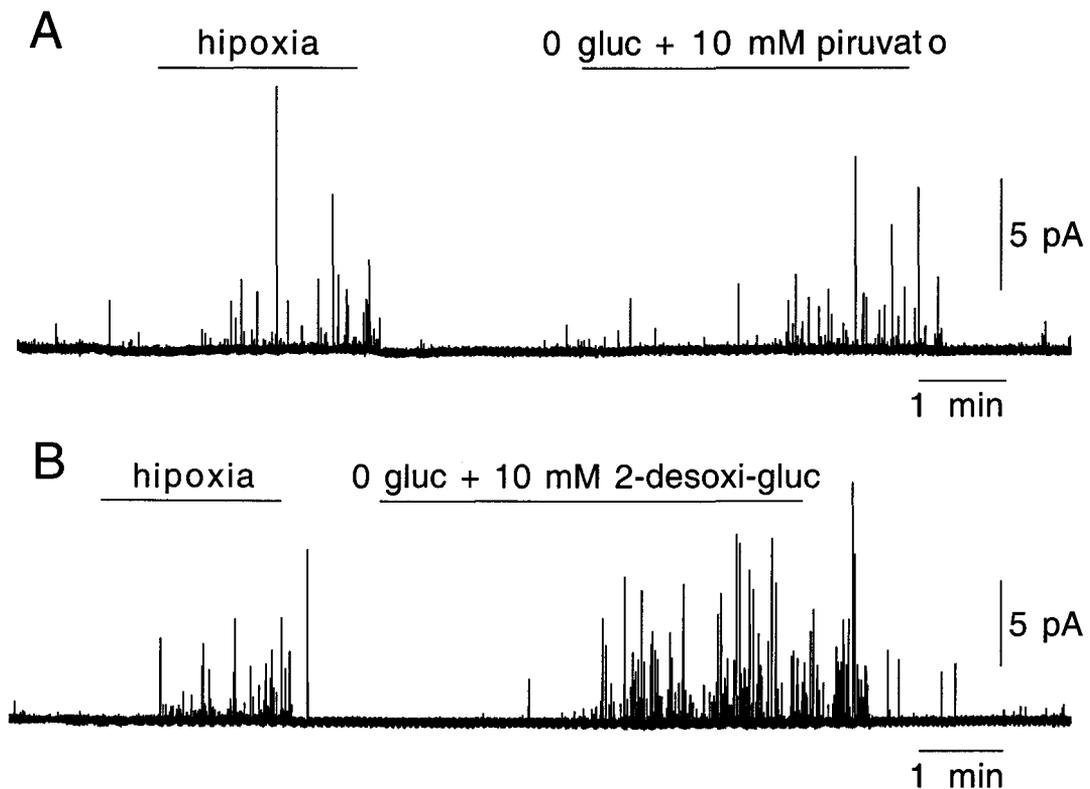


Figura 48. A. Respuesta secretora de una célula glómica a una solución externa hipoglucémica a la que además se le ha sustituido 10 mM NaCl por 10 mM piruvato sódico. B. Respuesta de otra célula glómica en distinta rodaja a una solución hipoglucémica con 10 mM 2-desoxi-glucosa.

5. 4. Interacción de la hipoxia con la hipoglucemia

Dado que las células glómicas responden a la hipoxia y a la hipoglucemia, se estudió también la relación existente entre ambos estímulos. Al provocar un aumento similar en la frecuencia de eventos secretores, en los dos casos de forma totalmente dependiente de calcio extracelular, cabría esperar una interacción más o menos estrecha entre ambos estímulos en la excitación de las células glómicas. En la figura 49 se muestra un resumen de las interacciones obtenidas entre los estímulos

hipoxia e hipoglucemia en la población de células glómicas estudiadas. En el panel A se muestra, por ejemplo, que la hipoxia ejerce una activación de la secreción mayor en presencia de la solución con 0 glucosa, lo que indica que los dos estímulos se potencian.

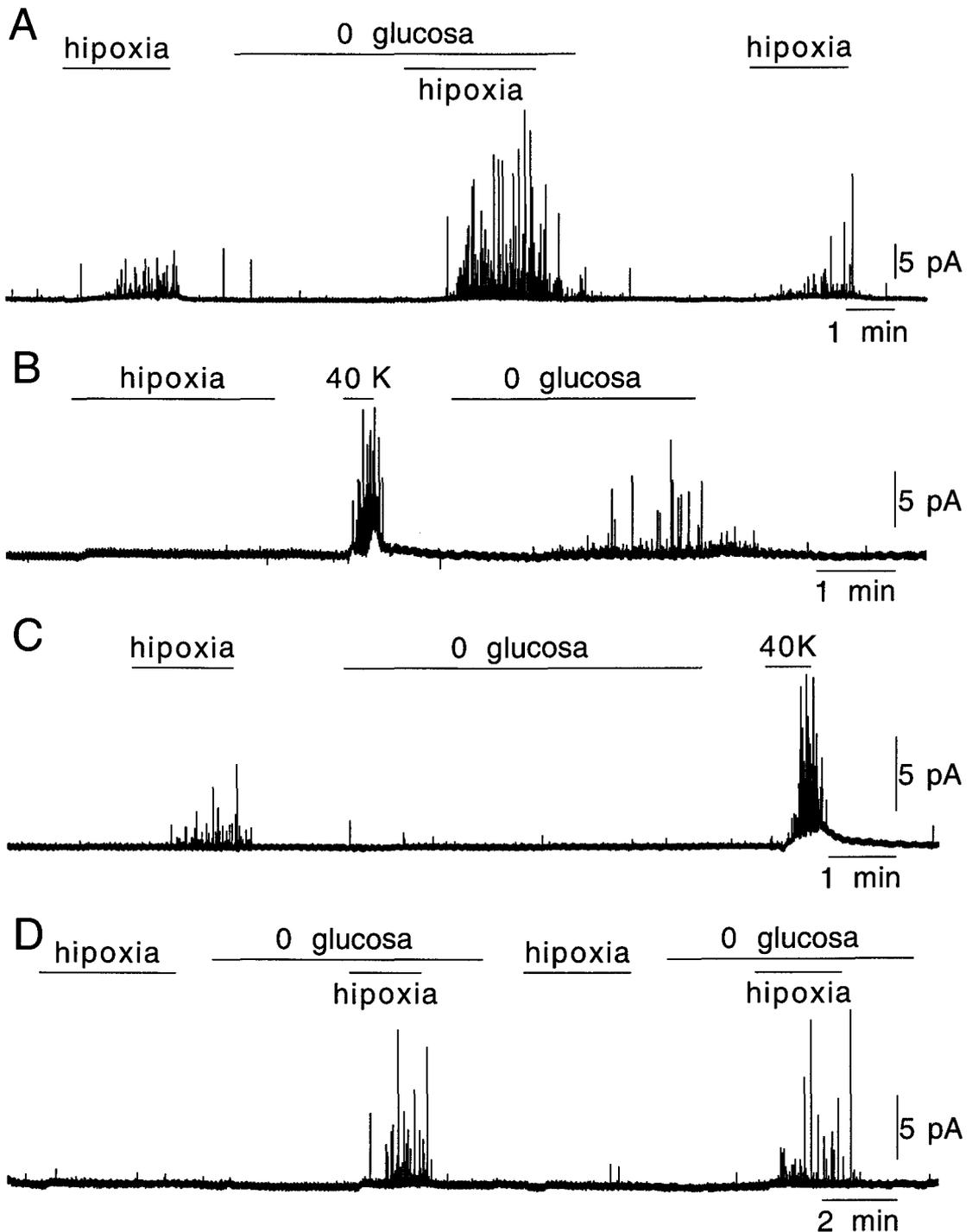


Figura 49. Respuestas secretoras inducidas en cuatro células glómicas de distintas rodajas, en respuesta a los distintos estímulos que se señalan sobre las barras horizontales.

Sin embargo el oxígeno y la glucosa parecen tener mecanismos sensores independientes ya que es posible registrar células que responden separadamente a ambos estímulos. En el panel B de la figura 49 se muestra una célula insensible a hipoxia pero capaz de responder a hipoglucemia, y en el panel C el caso contrario, una célula sensible a hipoxia pero que no responde al estímulo hipoglucémico. Finalmente existen células que no responden ni a hipoxia ni a hipoglucemia, pero sí lo hacen cuando se aplican ambos estímulos conjuntamente (Fig. 49C). Estos resultados sugieren que el incremento de la excitabilidad de las células glómicas producido por hipoxia e hipoglucemia es aditivo y que determina el aumento de actividad secretora si la despolarización de la membrana supera el umbral necesario para activar los canales de calcio voltaje-dependientes. La potenciación entre los estímulos hipóxico e hipoglucémico mostrada en los párrafos anteriores podría significar que en condiciones fisiológicas la sensibilidad del cuerpo carotídeo a la hipoglucemia es manifiestamente mayor en situaciones de hipoxia. En estas condiciones la estimulación adicional del cuerpo carotídeo ocurriría con hipoglucemias moderadas, lo que evitaría que los cambios en la pO_2 y en la glucemia dañasen al tejido cerebral.

5. 5. Efecto de la hipoglucemia sobre las corrientes de potasio

Tras la caracterización del efecto estimulador de la hipoglucemia sobre la actividad secretora de las células glómicas y dado que éste es dependiente de calcio extracelular y parece relacionado con fenómenos de membrana, se inició un estudio encaminado a determinar si los canales iónicos de la membrana participan en el proceso quimiotransductor. El objetivo específico ha sido estudiar si algunas de las corrientes iónicas se modifica por la aplicación de la hipoglucemia. Hasta la fecha, este objetivo sólo se ha desarrollado parcialmente, por lo que en

este apartado se exponen únicamente registros preliminares mostrando la acción de la hipoglucemia sobre la corriente de potasio macroscópica de las células glómicas. En la figura 50 se resume uno de tres experimentos realizados que muestran que la ausencia de glucosa en el medio de perfusión y en condiciones normóxicas regula la amplitud de la corriente de potasio. El panel A ilustra cómo la aplicación de la solución con 0 glucosa resulta en una inhibición reversible de las corrientes de potasio de hasta casi un 50% y en el panel B se muestra una curva corriente/voltaje en las tres condiciones experimentales.

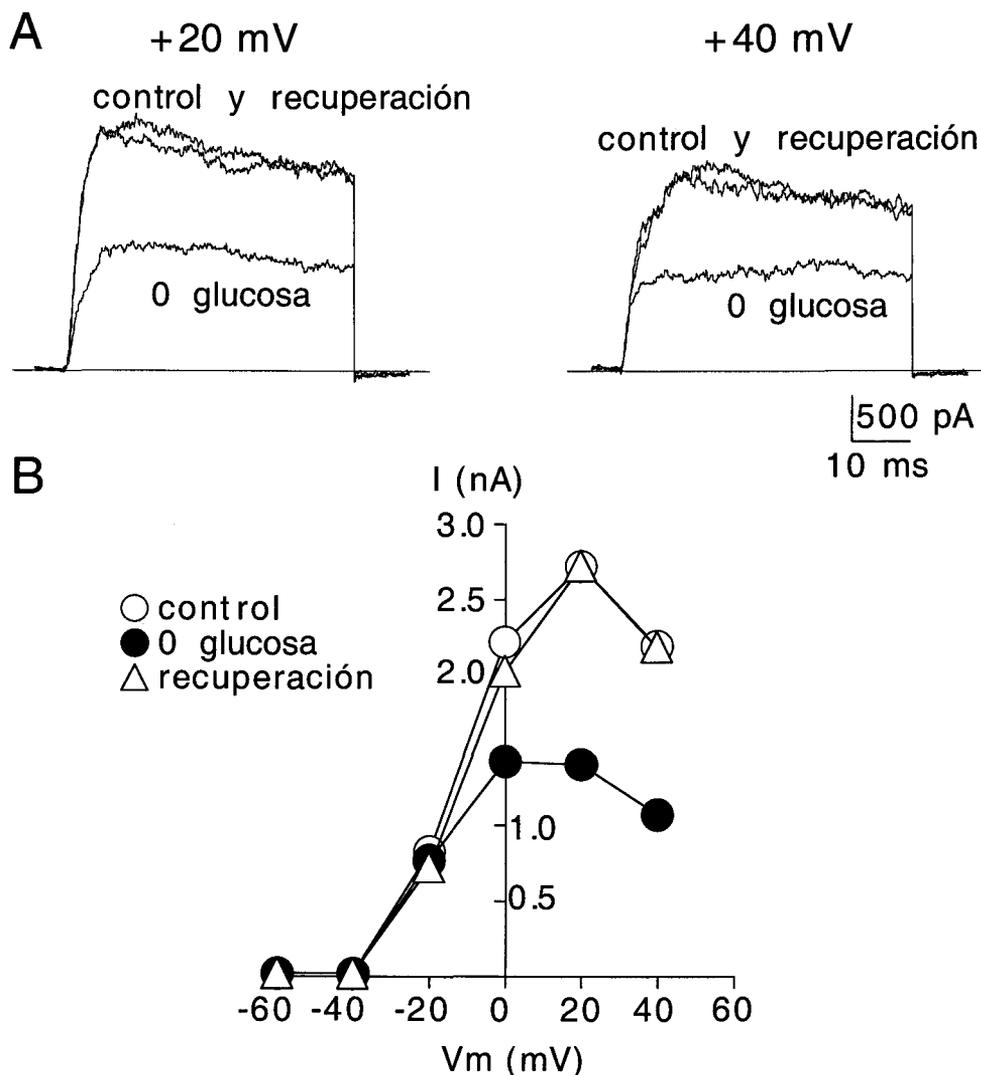


Figura 50. A. Corrientes de potasio registradas en una célula glómica en respuesta a pulsos despolarizantes de voltaje desde el potencial de membrana al potencial indicado, y en las distintas condiciones expresadas. B. Curva corriente/voltaje medida en el punto máximo de la corriente de salida.

El efecto de la hipoglucemia sobre las corrientes de potasio es relativamente rápido y, al igual que la respuesta secretora, se acelera con la exposición repetida a 0 glucosa. Un ejemplo del curso temporal de los cambios de la amplitud de la corriente de potasio con la hipoglucemia se muestra en la figura 51. Aunque como se indicó más arriba nuestros datos son preliminares, no parece que la exposición a 0 glucosa altere la voltaje-dependencia o la cinética de activación de la corriente.

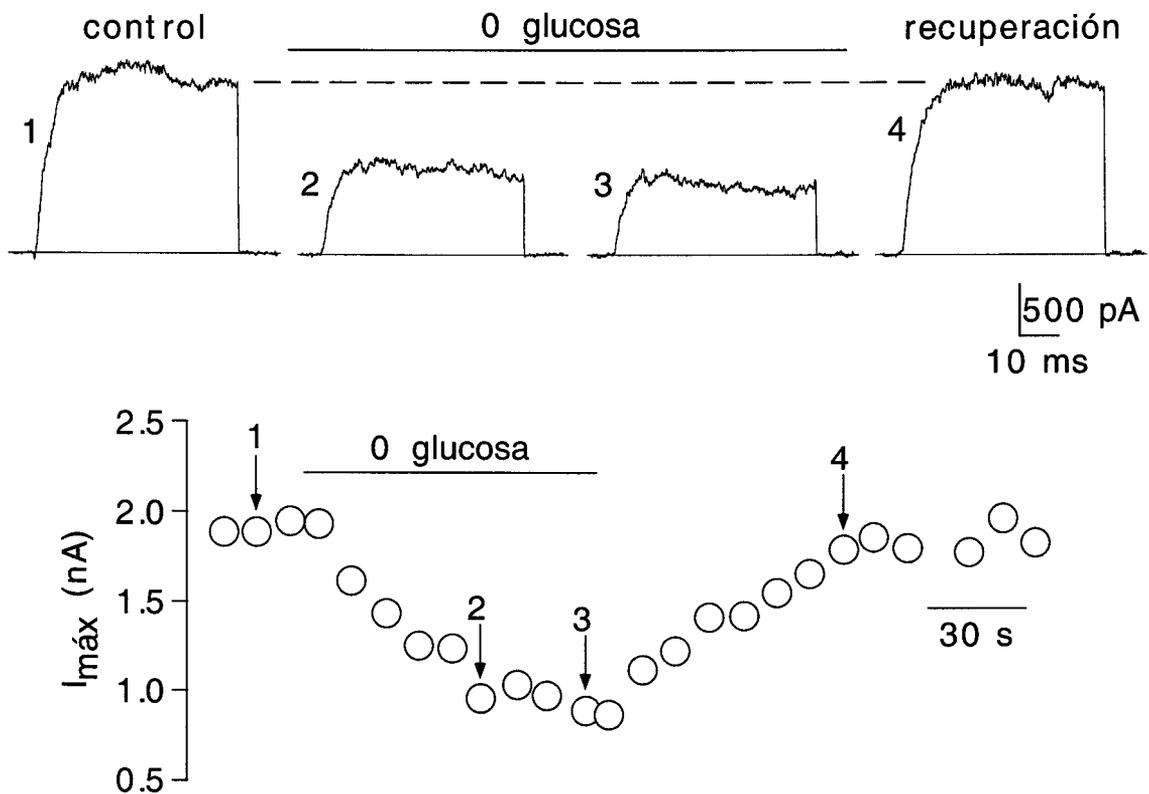


Figura 51. Curso temporal de la respuesta a hipoglucemia de las corrientes de potasio. Se representa la amplitud máxima de la corriente en respuesta a un tren de pulsos despolarizantes a +20 mV (un pulso cada 10 s). En el panel superior se muestran 4 ejemplos de las corrientes obtenidas en las distintas soluciones externas, control e hipoglucémica.

La curva corriente/voltaje mostrada en la figura 50B parece indicar que tras la reducción de la corriente por la hipoglucemia, el componente restante sigue mostrando la joroba a potenciales positivos característica de las corriente de potasio activadas por calcio sensibles a la hipoxia (ver Figs. 22 y 27, y apartado 2.1). Es posible por lo tanto que la hipoglucemia inhiba

a un canal rectificador tardío independiente de calcio. Sin embargo, parece que los niveles de glucosa pueden regular más de un tipo de canal, ya que como se ilustra en la figura 52, en alguna célula también produjo inhibición de la corriente transitoria de potasio (ver Fig. 23B). Aunque preliminares, nuestros datos sugieren que la hipoglucemia activa al cuerpo carotídeo a través de un mecanismo que converge con el de la hipoxia a nivel de los canales voltaje-dependientes de potasio. Ambos estímulos generarían un aumento de la excitabilidad de la célula con despolarización de la membrana plasmática, apertura de canales de calcio voltaje-dependientes y entrada de calcio extracelular como detonante de la exocitosis.

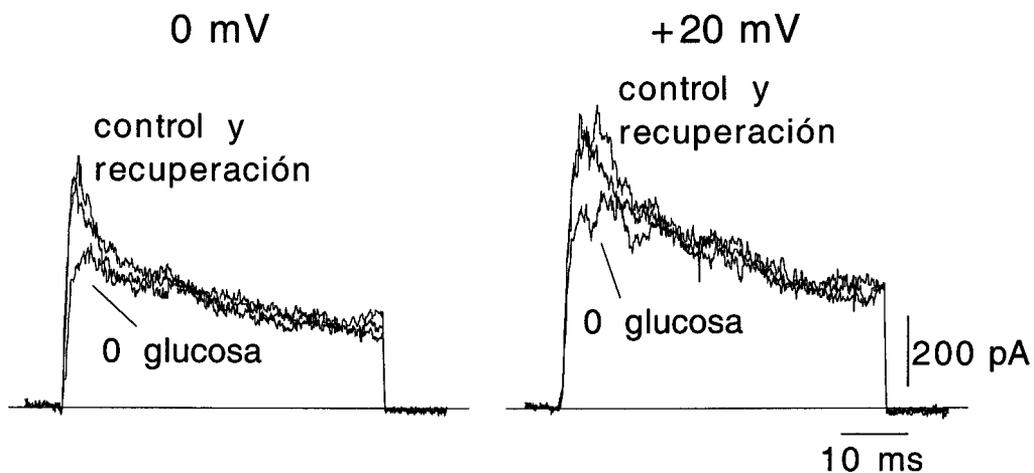


Figura 52. Corrientes de potasio generadas en una célula glómicula en respuesta a pulsos de voltaje despolarizantes desde el potencial de membrana hasta los potenciales indicados, y en las distintas condiciones expresadas.

DISCUSIÓN

1. La preparación de rodajas finas de cuerpo carotídeo

En este trabajo se describe una nueva preparación de cuerpo carotídeo de rata consistente en la obtención de rodajas finas ($\approx 150 \mu\text{m}$ de grosor) que se cultivan durante 2 a 4 días. Esta preparación ha permitido estudiar las respuestas de las células glómicas a diferentes estímulos sin haber sido sometidas a tratamiento enzimático o dispersión mecánica, lo que representa un paso adelante muy importante para determinar de forma precisa los mecanismos moleculares que subyacen a la función normal del cuerpo carotídeo. La preparación de rodajas finas ha demostrado ser particularmente útil para el estudio de la actividad secretora de catecolaminas en células únicas mediante amperometría y para el registro bajo control visual de corrientes iónicas con la técnica de *patch-clamp*.

Las propiedades electrofisiológicas generales de las células glómicas en las rodajas son parecidas a las descritas previamente para células glómicas dispersadas enzimáticamente (Peers, 1990; López-López y cols.,

1997). Sus respuestas a hipoxia, estudiadas tanto con la técnica de *patch-clamp* como con el registro de la actividad secretora, son también cualitativamente similares a las descritas previamente por nuestro grupo en células glómicas aisladas de conejo (Ureña y cols., 1994; Montoro y cols., 1996). En ambas especies la liberación de catecolaminas inducida por niveles fisiológicos de hipoxia ($pO_2 \approx 30$ mm de Hg) es totalmente dependiente de entrada de calcio extracelular. Por tanto, nuestros datos soportan la hipótesis de que las células glómicas se comportan como elementos neurosecretores sensibles a oxígeno. En ellas la entrada de calcio inducida por la despolarización en respuesta a hipoxia es el evento fundamental que desencadena la liberación de neurotransmisores y la activación de las fibras sensoriales aferentes (López-Barneo y cols., 1993; Ureña y col., 1994).

Una vez establecida la viabilidad de la preparación de rodajas de cuerpo carotídeo y llevada a cabo su caracterización general, nuestro trabajo se ha centrado en contrastar experimentalmente varias hipótesis e interrogantes que nos parecían de relevancia especial dentro de la fisiología del cuerpo carotídeo. En primer lugar se comprobó en las condiciones experimentales de las células en las rodajas (presumiblemente más "fisiológicas" que en células dispersas) si el bloqueo directo de canales de potasio voltaje-dependientes es suficiente para producir una respuesta neurosecretora similar a la inducida por la hipoxia. Dada la situación actual en el campo (ver "Introducción") este experimento nos pareció de importancia crucial para establecer de forma definitiva el importante papel de los canales de potasio sensibles al oxígeno como iniciadores del proceso quimiotransductor.

Posteriormente se han realizado experimentos con inhibidores mitocondriales para determinar si este orgánulo (aunque no involucrado directamente en el proceso secretor) tiene alguna participación como sensor de oxígeno y regulador de la permeabilidad iónica de la membrana.

Finalmente, la rodaja de cuerpo carotídeo nos pareció la preparación ideal para investigar si este órgano participa como glucosensor. Esta última hipótesis, que de forma más o menos implícita ha aparecido en la literatura especializada durante las últimas décadas (ver por ejemplo, Álvarez-Buylla y de Álvarez-Buylla, 1988), no ha sido posible abordarla experimentalmente de forma rigurosa hasta el momento actual.

2. Participación de los canales de potasio voltaje-dependientes en el mecanismo de quimiotransducción

Una de las observaciones más importantes llevada a cabo en este trabajo ha sido que la aplicación de bloqueantes de canales de potasio como el TEA o la IbTX induce en las células glómicas una respuesta secretora similar a la evocada por la hipoxia. Esta similitud contrasta con la falta de efecto del TEA sobre células glómicas de rata dispersadas enzimáticamente (Buckler, 1997). Además, nuestros resultados sugieren que el bloqueo directo de los canales de potasio sensibles a oxígeno, que en estas células son aquellos sensibles a TEA e IbTX (Peers, 1990; López-López y cols., 1997, ver Gálvez y cols., 1990), puede conducir a un aumento de la actividad secretora. De hecho se ha descrito que en células dispersas basta con aplicar el TEA en presencia de solución con alto potasio para obtener la respuesta secretora al bloqueante (Carpenter y cols., 2000), lo que sugiere que las células dispersas mantenidas en cultivo tienen un potencial de membrana algo hiperpolarizado con respecto al de las células en las rodajas. Por lo tanto, nuestros datos indican que la inhibición de canales de potasio voltaje-dependientes por la hipoxia puede contribuir a la iniciación de la respuesta secretora.

Una corriente de potasio tipo *leak*, insensible al TEA e inhibida preferentemente por anoxia o hipoxia extrema, ha sido descrita en células glómicas dispersadas enzimáticamente de cuerpo carotídeo de rata (Buckler, 1997). La presencia o no de ambos tipos de corrientes (la mediada

por canales K_{Ca} y la de tipo *leak*) en las mismas células glómicas, o si éstas se regulan de forma diferencial a lo largo del rango de pO_2 son cuestiones que deberán ser respondidas con futuros experimentos.

Basándonos en los datos del presente trabajo, es difícil entender la insensibilidad del cuerpo carotídeo completo al TEA, la caribdotoxina (CTX) o la 4-aminopiridina (4-AP) descrita por algunos autores (Doyle y Donnelly, 1994; Osanai y cols., 1997; Lahiri y cols., 1998). Aunque la identidad molecular de los canales de potasio de la sinapsis glómico-neural se desconoce, es lógico pensar que, independientemente de los mecanismos involucrados en la transducción del estímulo hipóxico, deben existir varios canales de potasio en la propia sinapsis y a lo largo de las fibras nerviosas aferentes. El bloqueo de estos canales con agentes farmacológicos (TEA, CTX, 4-AP, etc) debe por tanto alterar no solo la liberación de neurotransmisor por la célula glómica sino además la frecuencia y forma de los potenciales de acción que se propagan por la fibras nerviosas aferentes. Dado que los bloqueantes de canales de potasio utilizados (TEA, 4-AP o CTX) son moléculas relativamente grandes y poco permeables a través de bicapas lipídicas, es posible que en la preparación de cuerpo carotídeo completo perfundido a través de la arteria carótida, estas moléculas no alcancen las concentraciones adecuadas en el medio externo de las células glómicas.

3. Bloqueantes mitocondriales y mecanismo sensor de oxígeno

Como se indicó en "Introducción" está aceptado que el proceso de quimiotransducción en el cuerpo carotídeo depende fundamentalmente de eventos eléctricos de la membrana que determinan la entrada de calcio extracelular (ver Figs. 3 a 5). Sin embargo, la naturaleza y localización de las moléculas sensoras de O_2 y por tanto encargadas de detectar primariamente los niveles de pO_2 se desconoce. Desde hace tiempo varios grupos han propuesto que la mitocondria tiene una participación esencial

en el proceso de quimiotransducción del cuerpo carotídeo, y en muchas ocasiones la intoxicación mitocondrial, que activa al cuerpo carotídeo, se ha considerado como estímulo (hipoxia histotóxica) similar al de la reducción de la pO_2 (hipoxia hipóxica) (Mills y Jöbbsis, 1972; Biscoe y Duchon, 1989). En el presente trabajo se han comparado los efectos de intoxicadores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEM) con los producidos por la hipoxia. Además, se ha estudiado si algún componente de la CTEM podría participar como sensor de O_2 .

Ya que el O_2 es el aceptor final de los electrones que se transportan en la cadena respiratoria mitocondrial es lógico pensar que este orgánulo tenga una participación en la detección de las situaciones hipóxicas. De hecho, varios autores han mantenido durante décadas que la citocromo c oxidasa mitocondrial actúa como sensor de O_2 en el cuerpo carotídeo (Mills y Jöbbsis, 1972; Duchon y Biscoe, 1992a y b; Wilson y cols., 1994). Sobre la base de esta idea se postuló la hipótesis metabólica según la cual la inhibición de la oxidasa por descenso de la pO_2 modificaría el potencial de membrana mitocondrial, alterando de esta forma el control de la $[Ca^{2+}]$ citosólica por parte de este orgánulo. La posterior salida de iones calcio desde la mitocondria al citoplasma activaría el proceso de exocitosis del neurotransmisor (Biscoe y Duchon, 1990). Como se indicó anteriormente, basándose en estas ideas algunos autores han considerado que la intoxicación de la CTEM es semejante al estímulo hipóxico. Aunque los experimentos electrofisiológicos han mostrado que esta hipótesis no es correcta en su fundamento, es todavía posible que la mitocondria tenga una participación importante en el mecanismo quimiosensor generando especies reactivas de oxígeno (ERO) en función de los niveles de pO_2 . En varios laboratorios, incluido el nuestro (Archer y cols., 1993; Benot y cols., 1993; López-Barneo y cols., 1998), se ha sugerido que la hipoxia podría regular los fenómenos de membrana por un mecanismo de

reducción/oxidación ya que el efecto de agentes reductores sobre los canales regulados por el O_2 es muy similar al descenso de la pO_2 .

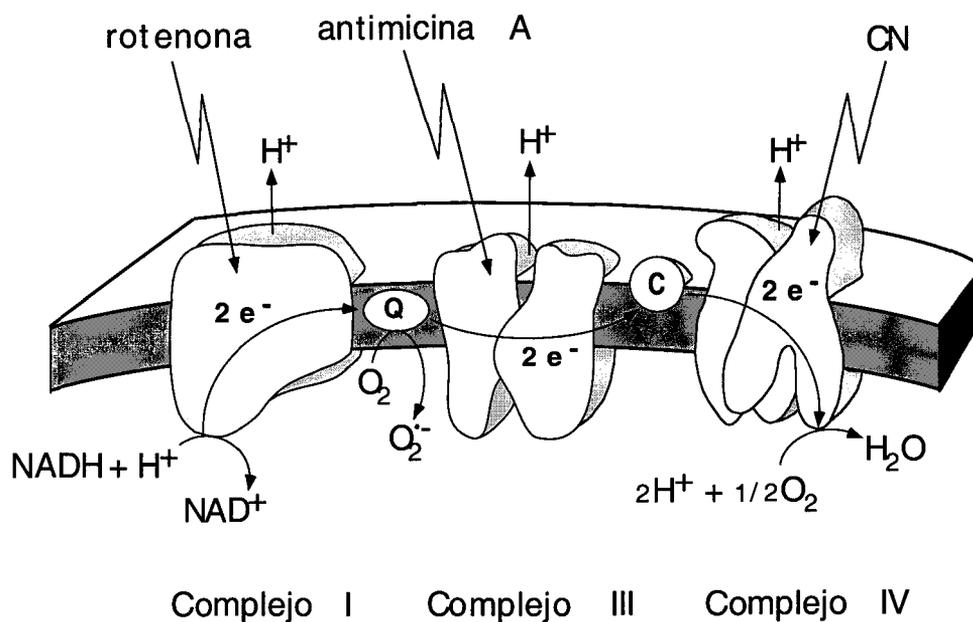


Figura 53. Esquema ilustrativo de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Se muestra el lugar donde actúan los distintos inhibidores utilizados en este estudio, y la producción de radicales superóxido a nivel de la ubiquinona.

En la CTEM no todos los electrones se utilizan para la formación de agua ya que existen puntos de "fuga" de electrones que dan lugar a la reducción parcial del O_2 y a la producción de radical superóxido (O_2^-). Existe superóxido dismutasa mitocondrial que convierte la especie muy reactiva O_2^- en H_2O_2 . Aunque se producen radicales superóxido en diferentes partes de la mitocondria, es en el complejo III (al nivel de la semiubiquinona) donde la formación de O_2^- es mayor (Chandel y cols., 1997; Duranteau y cols., 1998; ver Fig. 53). Por lo tanto, la inhibición mitocondrial a nivel de la citocromo c oxidasa utilizando cianuro produce un incremento de ERO por acumulación de ubiquinona reducida. Este hecho es opuesto, en principio, a lo que se sabe que produce la hipoxia fisiológica detectada por el cuerpo carotídeo o la arteria pulmonar, e indica que la hipoxia fisiológica y la intoxicación por CN son fenómenos distintos e incluso opuestos (Archer y cols., 1993). En nuestro trabajo se muestra que

la estimulación por CN es sustancialmente diferente a la hipoxia, lo cual está de acuerdo con datos de la literatura relacionados con la regulación de genes por hipoxia. Se sabe que el gen EPO (que codifica la eritropoyetina) y otros genes, se inducen por hipoxia y no por cianuro (Necas y Thorling, 1972; Pugh y cols., 1991; Chandel y cols., 1998). Además, en genes que se inducen tanto por la hipoxia como por la inhibición mitocondrial con CN, como es el gen que codifica el transportador de glucosa GLUT1, se ha descrito que ambos mecanismos de regulación dependen de secuencias distintas del promotor (Ebert y cols., 1995). En el presente trabajo se describen diferencias claras entre el incremento de la actividad secretora de las células glómicas inducido por aplicación de CN (efecto irreversible y dependiente en gran parte del calcio mitocondrial), y el inducido por la hipoxia fisiológica (efecto reversible y dependiente de forma absoluta del calcio extracelular).

Aun admitiendo la total separación entre la aplicación de cianuro y el estímulo hipóxico, sí parecen existir relaciones entre el efecto de la aplicación de rotenona, inhibidor proximal de la CTEM, y la baja pO_2 . La inhibición del complejo I mitocondrial por rotenona induce un aumento de la frecuencia de eventos secretores registrados en las células glómicas muy similar al evocado por la hipoxia, totalmente dependiente de calcio extracelular aunque, en el caso del inhibidor, el efecto es generalmente irreversible. Además, durante la aplicación de rotenona o incluso tras su lavado, la hipoxia no tiene efecto adicional sobre la secreción. Existe por tanto una oclusión entre ambos estímulos, sugiriendo que comparten sus mecanismos de acción. Esta oclusión de la rotenona sobre el efecto de la hipoxia está descrita en otros modelos celulares sensibles a oxígeno como la arteria pulmonar (Archer y cols., 1993), donde tanto la hipoxia como la rotenona disminuyen la producción de ERO consistente con una actuación sobre el complejo I mitocondrial (ver Fig. 53). La disminución de radicales libres genera un ambiente reductor que disminuye la probabilidad de

apertura de los canales de potasio, lo que conduce a la despolarización. Los datos obtenidos con rotenona en el presente trabajo también concuerdan con los resultados recientes que muestran un bloqueo claro por rotenona de la expresión de genes en respuesta a hipoxia (Chandel y cols., 1998). Además, está descrito que en células que no poseen ADN mitocondrial (y por lo tanto no tienen mitocondrias funcionales) no ocurre la activación de la expresión de genes por el descenso de la pO_2 (Chandel y cols., 1998). Sin embargo en el campo de la expresión de genes inducida por hipoxia existe una cierta confusión ya que si bien en la mayoría de los casos parece que la hipoxia da lugar a disminución de ERO y a estabilización de los factores de transcripción (HIF1 α o factor inducible por la hipoxia) que inducen a los genes (Huang y cols., 1996, 1998; Salceda y Caro, 1997; ver Semenza, 1999), en otros casos (sobre todo con hipoxia extrema y mantenida) se ha postulado que la hipoxia incrementa la producción de H_2O_2 de origen mitocondrial, lo que además estabiliza a los factores de transcripción (Chandel y cols., 1998).

Centrándonos en los mecanismos de regulación de canales iónicos, la mayoría de los datos experimentales indican que la condición de hipoxia y los agentes reductores tienen un efecto similar. Además de en la mitocondria, las especies oxidantes producidas en condiciones de normoxia también pueden proceder de una NADPH oxidasa de membrana similar a la de los macrófagos que produce el brote respiratorio. Este tipo de oxidasa se encuentra en varios tejidos (incluido el cuerpo carotídeo) y ha sido propuesta como sensor de oxígeno (Acker y cols., 1989; Cross y cols., 1990; Görlach y cols., 1993). Sin embargo, aunque el modelo de la NADPH oxidasa parece ser cierto para sistemas celulares como los cuerpos neuroepiteliales (Wang y cols., 1996; Fu y cols., 2000; O'Kelly y cols., 2000), el estudio de ratones sin la subunidad principal de la oxidasa y de líneas celulares derivadas de enfermos que carecen de la enzima funcional, revela que en otros tejidos la NADPH oxidasa no participa en el proceso sensor de

la tensión de O_2 (Wenger y cols., 1996; Archer y cols., 1999). En el cuerpo carotídeo parece que la aplicación de distintos inhibidores de la NADPH oxidasa no imita la activación del órgano por hipoxia (Obeso y cols., 2000).

El sensor de la pO_2 y la forma en que éste se acopla a los canales iónicos del cuerpo carotídeo se desconoce, aunque nuestro trabajo sugiere que una flavoproteína sensible a rotenona similar al complejo I mitocondrial participa en el proceso. Es indudable que la intoxicación mitocondrial con cianuro u otros agentes provoca una respuesta secretora en las células glómicas, sin embargo éste parece ser un estímulo independiente de la hipoxia fisiológica. La sensibilidad a los cambios de la pO_2 es un evento que al menos en células glómicas de conejo está muy asociado a la membrana ya que se mantiene inalterado en parches de membrana escindidos (Ganfornina y López-Barneo, 1991). Podría ocurrir, por tanto, que el sensor estuviese unido a la cara interna de la membrana de forma no covalente y que en determinadas circunstancias pueda disociarse o separarse del complejo oligomérico del canal. Esto explicaría la labilidad de la sensibilidad a la hipoxia y la existencia de preparaciones de células glómicas aparentemente normales pero que no responden a los cambios de pO_2 (ver López-Barneo y cols. 1998; ver apartado 2.2 de "Resultados"). Un modelo que podría explicar la sensibilidad a la hipoxia de las células glómicas se muestra de forma esquemática en la figura 54. Se considera como sensor primario una flavoproteína con un complejo Fe-S capaz de unir reversiblemente el O_2 dentro de los rangos fisiológicos de pO_2 . Esta proteína (que en la figura se representa como perteneciente al complejo I mitocondrial pero que podría estar en otro lugar) estaría acoplada a los canales iónicos sensibles al O_2 y en su conformación "desoxi" provocaría la disminución en la probabilidad de apertura del canal, bien alostéricamente o a través de la liberación local de algún intermediario. Si la proteína sensora es el complejo I mitocondrial, nuestro modelo llevaría implícito la asociación entre las mitocondrias y los canales

sensibles al O_2 , de modo que la separación de las mitocondrias de la membrana tendría como resultado una pérdida de la sensibilidad de las células a la hipoxia. No obstante, es razonable considerar que el sensor sensible a rotenona no sea necesariamente el complejo I mitocondrial sino que forme parte de algún otro complejo molecular, en orgánulos como por ejemplo los peroxisomas con cadenas de transporte electrónico de menor entidad que las mitocondrias (ver Halliwell y Gutteridge, 1999). Visto de este modo, la intoxicación mitocondrial (con cianuro o antimicina A) y la producción de ERO daría lugar independientemente del estímulo hipóxico al incremento de la exocitosis (posiblemente por potenciación de la actividad de canales de sodio o de calcio, o la liberación de Ca^{2+} mitocondrial). En células sensibles a la hipoxia, este estímulo sería selectivo e incrementaría la secreción por inhibición de los canales de potasio sensibles al O_2 . En estas células, la hipoxia y la inhibición farmacológica mitocondrial tendrían el efecto aditivo que se muestra en este trabajo.

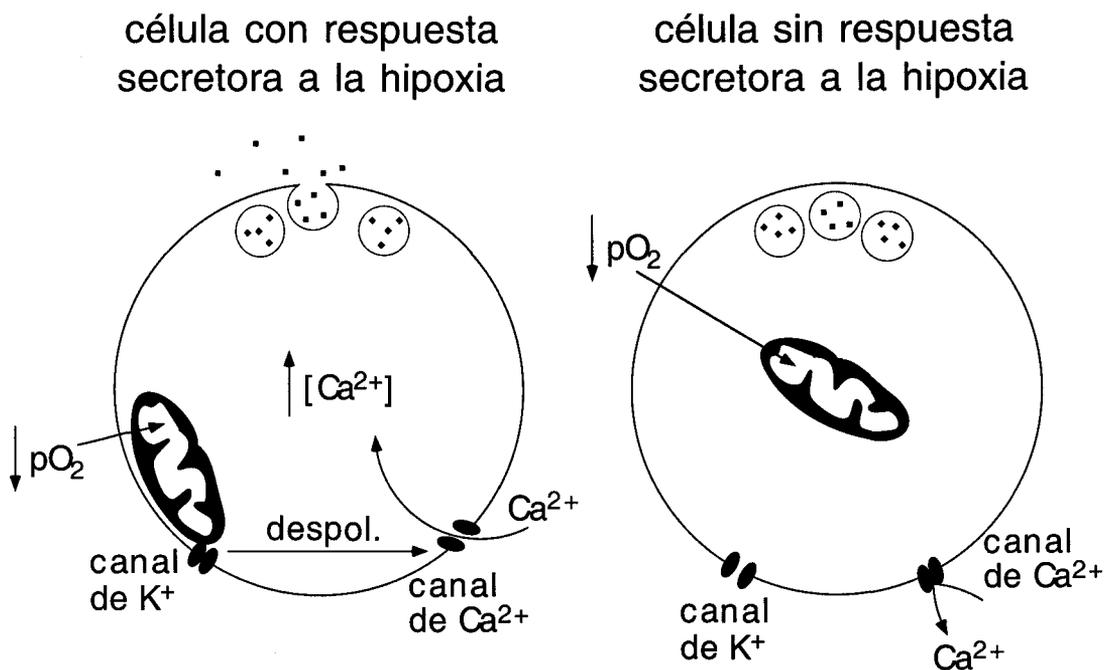


Figura 54. Esquema ilustrativo de la hipótesis acerca del sensor de oxígeno inhibible por rotenona en el cuerpo carotídeo.

4. El cuerpo carotídeo como glucosensor

Como se indicó anteriormente, desde hace tiempo se ha sugerido (sobre todo por Ramón Álvarez-Buylla y cols.) que el cuerpo carotídeo actúa como glucosensor y que en respuesta a la hipoglucemia se produce una activación del órgano que no sólo da lugar a la liberación de glucosa a la sangre sino que genera una mayor retención de glucosa en el cerebro (Álvarez-Buylla y de Álvarez-Buylla, 1988; Álvarez-Buylla y cols., 1997). Sin embargo, y posiblemente por limitaciones metodológicas, el papel glucosensor del cuerpo carotídeo y los mecanismos celulares subyacentes no se han podido demostrar de forma directa.

En este trabajo se muestra que las células glómicas en las rodajas responden con una actividad secretora importante ante la exposición a una solución externa sin glucosa y que el efecto depende de fenómenos de membrana ya que no se observa al bloquear los canales de calcio con Cd^{2+} . La curva dosis-respuesta del efecto activador de la hipoglucemia tiene una K_d de 150 μM glucosa, lo que indica que la concentración de glucosa debe descender marcadamente para activar de forma máxima al cuerpo carotídeo. Sin embargo, también hemos demostrado que existe una potenciación muy marcada entre el estímulo hipóxico y la hipoglucemia, lo que determina que en condiciones de hipoxia moderada el efecto estimulador de la hipoglucemia sea mucho mayor. La sensibilidad a la glucemia de las células glómicas podría tener repercusiones funcionales muy importantes al favorecer la estimulación máxima del centro respiratorio y los centros cerebrales que activan el sistema simpático-adrenal en condiciones de isquemia (hipoxia e hipoglucemia) y, de este modo, evitar la muerte neuronal.

El que la respuesta a hipoglucemia no se evite por la aplicación de piruvato o de 2-desoxiglucosa indica que el proceso glucosensor no depende del transporte de glucosa o de la disminución de ATP intracelular. De hecho, se sabe que el piruvato a las concentraciones usadas en este

trabajo es capaz de mantener intactos los niveles de ATP intracelulares en el cuerpo carotídeo (Obeso y cols., 1986). Además, nuestros experimentos preliminares utilizando la técnica de *patch-clamp* en células dializadas muestran que el efecto de la hipoglucemia sobre las corrientes de potasio se mantiene en presencia de 4 mM Mg-ATP intracelular. Estos datos indican que la sensibilidad a la glucosa de las células glómicas no depende del metabolismo oxidativo, al contrario de lo que está bien demostrado ocurre en las células β del páncreas endocrino (Ashcroft y cols., 1984). Sin embargo, sí parece ser necesaria la metabolización de la glucosa posiblemente por una vía que no implica la síntesis de ATP (ver más abajo). La estimulación de la actividad secretora de las células glómicas por la hipoglucemia recuerda a la fisiología de las células α del páncreas, que responden con la liberación de glucagón cuando disminuye la glucosa extracelular. No obstante, el mecanismo de estimulación de estas últimas células se desconoce (Bokvist y cols., 1999).

Nuestros datos sugieren de forma que creemos convincente que el mecanismo sensor de la glucosa tiene relación directa con el funcionamiento de los canales de potasio. En células registradas con la técnica de *patch-clamp* hemos podido mostrar la inhibición de corrientes macroscópicas de potasio por la hipogucemia y, en algún caso, parece observarse de forma clara que esta inhibición se debe a la reducción de la amplitud de la corriente no dependiente de Ca^{2+} (ver Fig. 50). Sobre la base de estas observaciones es atractivo pensar que la sensibilidad a la glucosa dependa de algún sensor metabólico existente en los canales iónicos voltaje-dependientes. Las moléculas más adecuadas para llevar a cabo este papel son las subunidades β de los canales de la familia Kv que se sabe se unen a las subunidades α por la cara interna de la membrana y forman parte del complejo multimérico del canal. Se ha descrito que este tipo de subunidades tienen una secuencia con una homología alta con los enzimas de la familia de las aldo/ceto reductasas, capaces de reducir

reversiblemente grupos aldehidos o cetónicos a sus alcoholes primarios captando o transfiriendo un protón desde el anillo nicotinamida del NADP o el NADPH (McCormack y McCormack, 1994; Jez y cols., 1997). De hecho, un estudio cristalográfico reciente de una subunidad β de canales de potasio ha mostrado la existencia en su estructura de zonas características de unión de sustratos, como alguna hexosa y el NADPH (ver ilustración en portada; Gulbis y cols., 1999).

Sobre la base de los datos descritos anteriormente nuestra propuesta es que exista en las células glómicas alguna aldo/ceto reductasa (bien la propia subunidad β o asociada a su vez a la subunidad β de los canales de potasio Kv) capaz de metabolizar la glucosa y de producir una variación de los niveles de NADPH en función de la glucosa extracelular. La disminución del NADPH en condiciones de hipoglucemia causaría modificación de la estructura de la subunidad β , lo que a su vez conduciría a la inhibición de los canales de potasio, al aumento de excitabilidad celular, a la apertura de canales de calcio y a estimulación de la secreción (Fig. 55).

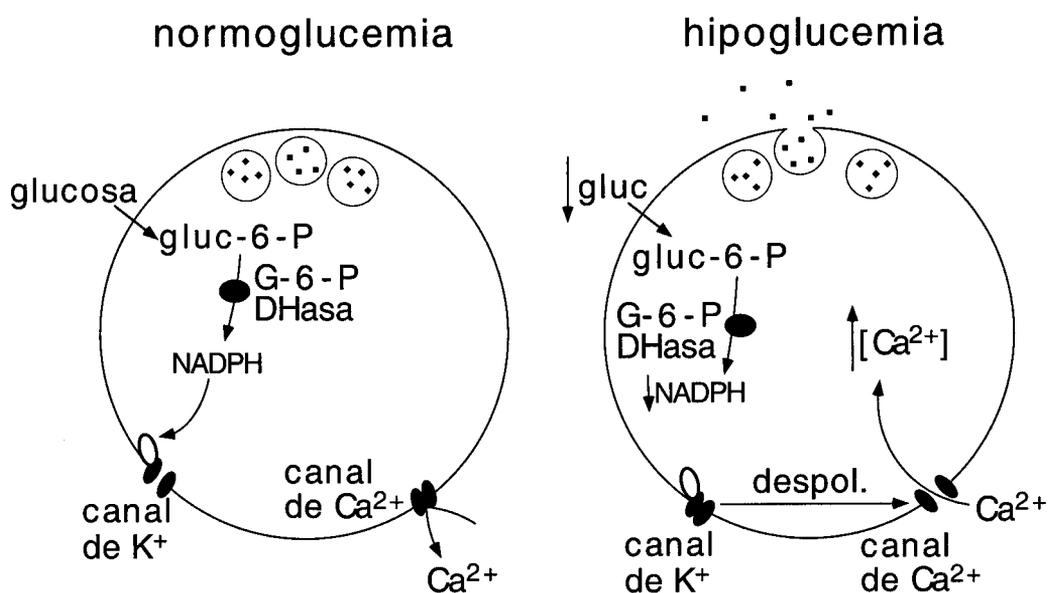


Figura 55. Esquema ilustrativo de la hipótesis acerca del mecanismo sensor de glucosa en las células glómicas del cuerpo carotídeo.

Dentro de las posibles alternativas, parece interesante sugerir, como se indica en la figura 55, que la molécula que detecta la glucosa sea la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), enzima muy regulada y limitante en la ruta de las pentosas fosfato, que se sabe oxida un grupo alcohol de la glucosa y genera NADPH. De hecho, la K_d (150 μ M glucosa) del proceso que regula la secreción en respuesta a la hipoglucemia es muy similar al valor descrito para la G6PD (Lehninger, 1979). La comprobación experimental de esta hipótesis es parte del trabajo actual de nuestro laboratorio y, de confirmarse, demostraría el papel de los canales iónicos de potasio como moléculas que permiten la interacción entre la actividad electrofisiológica y el metabolismo celular.

Nuestros datos abren un nuevo capítulo en la fisiología molecular de las células glómicas, donde variables fisiológicas como la tensión de O_2 y la glucemia convergen para determinar cambios de actividad electrofisiológica que ponen en marcha reflejos adaptativos de un valor fundamental en la homeostasis del organismo.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo son:

1. La preparación de rodajas finas de cuerpo carotídeo permite el estudio de las células glómicas sin que hayan sufrido el proceso de tratamiento enzimático y dispersión mecánica del tejido utilizado en los protocolos clásicos. El nuevo abordaje experimental permite además el estudio electrofisiológico mediante las técnicas de *patch-clamp* y de registro amperométrico de células glómicas únicas bajo control visual directo.
2. Las células glómicas en las rodajas poseen unas características electrofisiológicas generales (corrientes iónicas, actividad secretora, etc) similares a las descritas en células dispersadas enzimáticamente. Además, sus respuestas a hipoxia son también cualitativamente parecidas a las obtenidas en células aisladas.

3. La aplicación de bloqueantes de canales de potasio voltaje-dependientes como el TEA o la IbTX induce en las células glómicas un aumento de la actividad secretora muy similar al evocado por la hipoxia, lo que sugiere que la inhibición de canales de potasio por el descenso de la pO_2 puede ser un evento crucial en el inicio de la transducción del estímulo hipóxico.

4. El bloqueo de la citocromo c oxidasa mitocondrial por cianuro (CN) en las células glómicas genera una respuesta secretora de características muy distintas a la activación por hipoxia. Mientras que el descenso de la pO_2 produce un aumento de la actividad secretora reversible y totalmente dependiente de calcio extracelular, la aplicación de CN induce un aumento irreversible de la frecuencia de eventos secretores y solo parcialmente dependiente de calcio extracelular. Además, la existencia de células que responden a la aplicación de CN siendo insensibles a la falta de oxígeno confirma que la llamada hipoxia histotóxica (intoxicación metabólica por aplicación de CN) no es equivalente a la hipoxia fisiológica.

5. El aumento de la actividad secretora inducido por aplicación de rotenona o antimicina A (inhibidores proximales de la cadena de transporte de electrones mitocondrial), tiene características diferentes a la activación por aplicación de CN. En el caso de los inhibidores proximales la respuesta es menos intensa y totalmente dependiente de calcio extracelular. Nuestros datos indican que los efectos inducidos por intoxicación metabólica no son siempre idénticos, sino que dependen del inhibidor mitocondrial utilizado.

6. El efecto de la rotenona sobre la secreción de las células glómicas en las rodajas es particularmente interesante, ya que no sólo posee características similares a la activación por hipoxia sino que además ocluye el efecto de ésta. Este resultado sugiere que ambos estímulos, hipoxia y aplicación de rotenona, podrían estar compartiendo el mecanismo de acción.

7. Las células glómicas en las rodajas responden a la falta de glucosa en el medio de perfusión incrementando su actividad secretora hasta niveles equiparables a los alcanzados con un estímulo hipóxico. Esta secreción en respuesta a hipoglucemia depende en su totalidad de entrada de calcio externo, sugiriendo que el proceso glucosensor en el cuerpo carotídeo es voltaje-dependiente y está asociado a eventos de membrana.

8. Los resultados obtenidos de la aplicación de piruvato y 2-deoxiglucosa indican que el proceso de detección de la glucosa en el cuerpo carotídeo, aunque requiere algún paso de metabolización del azúcar, no depende del metabolismo mitocondrial ni de los niveles de ATP celulares.

9. Datos preliminares obtenidos mediante la técnica de *patch-clamp* indican que la hipoglucemia disminuye reversiblemente la amplitud de las corrientes de potasio voltaje-dependientes en las células glómicas. Esta inhibición de canales de potasio por falta de glucosa podría conducir a la despolarización, apertura de canales de calcio voltaje-dependientes, entrada de calcio y activación de la secreción.

BIBLIOGRAFÍA

Abudara V., y Eyzaguirre C. (1994). Electrical coupling between cultured glomus cells of the rat carotid body: observations with current and voltage clamping. **Brain Research**. Vol. 664; pp 257-265.

Acker H., Dufau E., Huber J., y Sylvester D. (1989). Indications to an NADPH oxidase as a possible pO₂ sensor in the rat carotid body. **FEBS Letters**. Vol. 256; pp 75-78.

Álvarez-Buylla R., Álvarez-Buylla E., Mendoza H., Montero S. A., y Álvarez-Buylla A. (1997). Pituitary and adrenals are required for hyperglycemic reflex initiated by stimulation of CBR with cyanide. **American Journal of Physiology**. Vol. 272; pp R392-R399.

Álvarez-Buylla R., y de Álvarez-Buylla E. R. (1988). Carotid sinus receptors participate in glucose homeostasis. **Respiration Physiology**. Vol. 72; pp 347-360.

Álvarez de Toledo G., Fernández-Chacón R., y Fernández J. M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. **Nature**. Vol. 363; pp 554-558.

Archer S. L., Huang J., Henry T., Peterson D., y Weir E. K. (1993). A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. **Circulation Research**. Vol. 73; pp 1100-1112.

Archer S. L., Reeve H. L., Michelakis E., Puttagunta L., Waite R., Nelson D. P., Dinauer M. C., y Weir E. K. (1999). O₂ sensing is preserved in mice lacking the gp91 phox subunit of NADPH oxidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 96; pp 7944-7949.

Ashcroft F. M., Harrison D. E., y Ashcroft S. J. H. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. **Nature**. Vol. 312; pp 446-448.

Bairam A., Neji H., De-Grandpre P., y Carroll J. L. (2000). Autoreceptor mechanism regulating carotid body dopamine release from adult and 10-day-old rabbits. **Respiration Physiology**. Vol. 120; pp 27-34.

Benot A. R., Ganfornina M. D., y López-Barneo. (1993). Potassium channel modulated by hypoxia and the redox status in glomus cells of the carotid body. En: **Ion flux in pulmonary vascular control**. Weir E. K. y cols., eds. New York: Plenum Press.

Benot A. R., y López-Barneo J. (1990). Feedback inhibition of Ca²⁺ currents by dopamine in glomus cells of the carotid body. **European Journal of Neuroscience**. Vol. 2; pp 809-812.

Bernthal T., y Weeks W. F. (1939). Respiratory and vasomotor effects of variations in carotid body temperature. A study of the mechanism of chemoreceptor stimulation. **American Journal of Physiology**. Vol. 127; pp 94-105.

Biscoe T. J., y Duchen M. R. (1989). Electrophysiological responses of dissociated type I cells of the rabbit carotid body to cyanide. **The Journal of Physiology**. Vol. 413; pp 447-468.

Biscoe T. J., y Duchen M. R. (1990). Cellular basis of transduction in carotid chemoreceptors. **American Journal of Physiology**. Vol. 258; pp L271-L278.

Biscoe T. J., Purves M. J., y Sampson S. R. (1970). The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibers recorded *in vivo* with intact circulation. **The Journal of Physiology**. Vol. 208; pp 121-131.

Bokvist K., Olsen H. L., Hoy M., Gotfredsen C. F., Holmes W. F., Buschard K., Rorsman P., y Gromada J. (1999). Characterisation of sulphonylurea and ATP-regulated K^+ channels in rat pancreatic A-cells. **Pflügers Archives**. Vol. 438; pp 428-436.

Buckler K. J. (1997). A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. **The Journal of Physiology**. Vol. 498; pp 649-662.

Buckler K. J., y Vaughan-Jones R. D. (1994). Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. **The Journal of Physiology**. Vol. 476; pp 423-428.

Buckler K. J., y Vaughan-Jones R. D. (1998). Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells. **The Journal of Physiology**. Vol. 513; pp 819-833.

Bunn H. F., y Poyton R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. **Physiological Reviews**. Vol. 76; pp 839-885.

Carpenter E., Hatton C. J., y Peers C. (2000). Effects of hypoxia and dithionite on catecholamine release from isolated type I cells of the rat carotid body. **The Journal of Physiology**. Vol. 523; pp 719-729.

Chandel N., Budinger G. R. S., Sanders W. M., y Schumacker P. T. (1997). Cytochrome c oxidase: a potential oxygen sensor underlying hypoxic suppression of cellular respiration. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. Vol. 155; p A402.

Chandel N. S., Maltepe E., Goldwasser E., Mathieu C. E., Simon M. C., y Schumacker P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 95; pp 11715-11720.

Chow R. H., y Von Rüden L. (1996). Electrochemical detection of secretion from single cells. En: **Single-Channel Recording**, (2nd. ed.). Sakmann B. y Neher E. eds., pp 245-275. New York: Plenum Press.

Chow R. H., von Rüden L., y Neher E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. **Nature**. Vol. 356; pp 60-63.

Cross A. R., Henderson L., Jones O. T. G., Delpiano M. A., Hentschel J., y Acker H. (1990). Involvement of an NAD(P)H oxidase as a pO_2 sensor protein in the rat carotid body. **Biochemical Journal**. Vol. 272; pp 743-747.

De Castro F. (1926). Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome du nerf glosso-pharyngien. **Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid**. Vol. 24; pp 365-432.

Delpiano M. A., y Hescheler J. (1989). Evidence for a pO₂-sensitive K⁺ channel in the type-I cell of the rabbit carotid body. **FEBS Letters**. Vol. 249; pp 195-198.

Docherty R. J., y McQueen D. S. (1978). Inhibitory action of dopamine on cat carotid chemoreceptors. **The Journal of Physiology**. Vol. 279; pp 425-438.

Donnelly D. F. (1995). Modulation of glomus cell membrane currents of intact rat carotid body. **The Journal of Physiology**. Vol. 489; pp 677-688.

Doyle T. P., y Donnelly D. F. (1994). Effect of Na⁺ and K⁺ channel blockade on baseline and anoxia-induced catecholamine release from rat carotid body. **Journal of Applied Physiology**. Vol. 77; pp 2606-2611.

Duchen M. R., y Biscoe T. J. (1992a). Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. **The Journal of Physiology**. Vol. 450; pp 13-31.

Duchen M. R., y Biscoe T. J. (1992b). Relative mitochondrial membrane potential and [Ca²⁺]_i in type I cells isolated from the rabbit carotid body. **The Journal of Physiology**. Vol. 450; pp 33-61.

Duchen M. R., Caddy K. W., Kirby G. C., Patterson D. L., Ponte J., y Biscoe T. J. (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. **Neuroscience**. Vol. 26; pp 291-311.

Duranteau J., Chandel N. S., Kulisz A., y Schumacker P. T. (1998). Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 273; pp 11619-11624.

Ebert B. L., Firth J. D., y Ratcliffe P. J. (1995). Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 270; pp 29083-29089.

Eden G. J., y Hanson M. A. (1987). Maturation of the respiratory response to acute hypoxia in the newborn rat. **The Journal of Physiology**. Vol. 392; pp 1-9.

- Edwards F. A., Konnerth A., Sakmann B., y Takahashi T. (1989). A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. **Pflügers Archives**. Vol. 414; pp 600-612.
- Fidone S. J., y González C. (1986). Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. En: **Handbook of Physiology. The respiratory system**. Vol. II. Fishman A. P., ed., pp 247-312. American Physiological Society, MD.
- Fitzgerald R. S., y Lahiri S. (1986). Reflex responses to chemoreceptor stimulation. En: **Handbook of Physiology. The respiratory system**. Vol. II. Fishman A. P., ed., pp 313-362. American Physiological Society, MD.
- Fu X. W., Wang D., Nurse C. A., Dinauer M. C., y Cutz E. (2000). NADPH oxidase is an O₂ sensor in airway chemoreceptors: Evidence from K⁺ current modulation in wild-type and oxidase-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 97; pp 4374-4379.
- Gallego R., y Belmonte C. (1979). The effects of blood osmolality changes on cat carotid body chemoreceptors *in vivo*. **Pflügers Archives**. Vol. 380; pp 53-58.
- Gálvez A., Gimenez-Gallego G., Reuben J. P., Roy-Contancin L., Feigenbaum P., Kaczorowski G. J., y García M. L. (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 265; pp 11083-11090.
- Ganformina M. D., y López-Barneo J. (1991). Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 88; pp 2927-2930.
- Ganformina M. D., y López-Barneo J. (1992). Gating of O₂-sensitive K⁺ channels of arterial chemoreceptor cells and kinetic modifications induced by low pO₂. **The Journal of General Physiology**. Vol. 100; pp 427-455.
- Gómez L. P. (1908). The anatomy and pathology of the carotid gland. **American Journal of Medical Science**. Vol. 136; pp 98-111.
- González C., Almaraz L., Obeso A., y Rigual R. (1994). Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. **Physiological Reviews**. Vol. 74; pp 829-898.

Görlach A., Fandrey J., Holtermann G., y Acker H. (1994). Effects of cobalt on haem proteins of erythropoietin-producing HepG2 cells in multicellular spheroid culture. **FEBS Letters**. Vol. 348; pp 216-223.

Gulbis J. M., Mann S., y Mackinnon R. (1999). Structure of a voltage-dependent K⁺ channel β subunit. **Cell**. Vol. 97; pp 943-952.

Halliwell B., y Gutteridge M. C. (1999). **Free radicals in biology and medicine**, (3rd. ed.). OXFORD University Press.

Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., y Sigworth F. J. (1981). Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archives**. Vol. 391; pp 85-100.

Hatton C. J., Carpenter E., Pepper D. R., Kumar P., y Peers C. (1997). Developmental changes in isolated rat type I carotid body cell K⁺ currents and their modulation by hypoxia. **The Journal of Physiology**. Vol. 501; pp 49-58.

Heymans C., Bouckaert J. J., y Dautrebande L. (1930). Sinus carotidien et réflexes respiratoires. II. Influences respiratoires réflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de l'ion hydrogène et de l'anoxémie: sinus carotidiens et échanges respiratoires dans le poumons et au delà des poumons. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** Vol. 39; pp 400-408.

Hornbein T. F. Z., Griffo Z. F., y Roos A. (1961). Quantitation of chemoreceptor activity: interrelation of hypoxia and hypercapnia. **Journal of Neurophysiology**. Vol. 24; pp 561-568.

Hornbein T. Z. F., y Roos A. (1963). Specificity of H ion concentration as a carotid chemoreceptor stimulus. **Journal of Applied Physiology**. Vol. 18; pp 580-584.

Huang L. E., Arany Z., Livingston D. M., y Bunn H. F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its α subunit. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 271; pp 32253-32259.

Huang L. E., Gu J., Schau M., y Bunn H. F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 95; pp 7987-7992.

Inoue M., Fujishiro N., y Imanaga I. (1998). Hypoxia and cyanide induce depolarization and catecholamine release in dispersed guinea-pig chromaffin cells. **The Journal of Physiology**. Vol. 507; pp 807-818.

Jez J. M., Bennett J., Schlegel B. P., Lewis M., y Penning T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. **Biochemical Journal**. Vol. 326; pp 625-636.

Jiang C., y Haddad G. G. (1994). Oxygen deprivation inhibits a K⁺ channel independently of cytosolic factors in rat central neurons. **The Journal of Physiology**. Vol. 481; pp 15-26.

Kholwadwala D., y Donnelly D. F. (1992). Maturation of carotid chemoreceptor sensitivity to hypoxia: in vitro studies in the newborn rat. **The Journal of Physiology**. Vol. 453; pp 461-473.

Lahiri S., Roy A., Rozanov C., y Mokashi A. (1998). K⁺-current modulated by pO₂ in type I cells in rat carotid body is not a chemosensor. **Brain Research**. Vol. 794; pp 162-165.

Landgren S., y Neil E. (1951). Chemoreceptor impulse activity following haemorrhage. **Acta Physiol. Scand.** Vol. 23; pp 158-167.

Lehninger A. L. (1979). **Bioquímica**, (2^a ed.). Barcelona: Ediciones Omega.

Lindau M., y Neher E. (1988). Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. **Pflügers Archives**. Vol. 411; pp 137-146.

López-Barneo J. (1991). Voltage-dependent ionic channels: "whole-cell" recording by patch-clamp techniques. En: **Cell Membrane Transport**. Yudilevich D. L., y cols. eds., pp 215-237. New York: Plenum Press.

López-Barneo J. (1994). Oxygen-sensitive ion channels: how ubiquitous are they?. **Trends in Neurosciences**. Vol. 17; pp 133-135.

López-Barneo J. (1996). Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions. **Trends in Neurosciences**. Vol. 19; pp 435-440.

López-Barneo J., Benot A. R., y Ureña J. (1993). Oxygen sensing and the electrophysiology of arterial chemoreceptor cells. **News in Physiological Sciences**. Vol. 8; pp 191-195.

López-Barneo J., López-López J. R., Ureña J., y González C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by pO₂ in type I chemoreceptor cells. **Science**. Vol. 241; pp 580-582.

López-Barneo J., Montoro R., Ortega-Sáenz P., y Ureña J. (1998). Oxygen-regulated ion channels: Functional roles and mechanisms. En: **Oxygen Regulation of Ion Channels and Gene Expression**. López-Barneo J., y Weir E. K. eds., pp 127-144. New York: Futura Publishing Company.

López-López J. R., González C., y Pérez-García M. T. (1997). Properties of ionic currents from isolated adult rat carotid body chemoreceptor cells: effect of hypoxia. **The Journal of Physiology**. Vol. 499; pp 429-441.

López-López J., González C., Ureña J., y López-Barneo J. (1989). Low pO₂ selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. **The Journal of General Physiology**. Vol. 93; pp 1001-1015.

McCormack T., y McCormack K. (1994). Shaker K⁺ Channel β subunits belong to an NAD(P)H-dependent oxidoreductase superfamily. **Cell**. Vol. 79; pp 1133-1135.

Mills E., y Jöbsis F. F. (1972). Mitochondrial respiratory chain of carotid body and chemoreceptor response to changes in oxygen tension. **Journal of Neurophysiology**. Vol. 35; pp 405-428.

Mojet M. H., Mills E., y Duchen M. R. (1997). Hypoxia-induced catecholamine secretion in isolated newborn rat adrenal chromaffin cells is mimicked by inhibition of mitochondrial respiration. **The Journal of Physiology**. Vol 504; pp 175-189.

Montoro R. J. , Ureña J., Fernández-Chacón R., Álvarez de Toledo G., y López-Barneo J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. **The Journal of General Physiology**. Vol. 107; pp 133-143.

Necas E., y Thorling E. B. (1972). Unresponsiveness of erythropoietin-producing cells to cyanide. **American Journal of Physiology**. Vol. 222; pp 1187-1190.

Neher E., y Marty A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 79; pp 6712-6716.

Nowicky A. V., y Duchen M. R. (1998). Changes in [Ca²⁺]_i and membrane currents during impaired mitochondrial metabolism in dissociated rat hippocampal neurons. **The Journal of Physiology**. Vol. 507; pp 131-145.

Obeso A., Almaraz L., y González C. (1986). Effects of 2-deoxy-D-glucose on in vitro cat carotid body. **Brain Research**. Vol. 371; pp 25-36.

Obeso A., Sanz-Alfayate G., Agapito M. T., y González C. (2000). Significance of ROS in oxygen chemoreception in the carotid body chemoreception. Apparent lack of a role for NADPH oxidase. **Adv. Exp. Med. Biol.** Vol. 475; pp 425-434

O'Kelly I., Lewis A., Peers C., y Kemp P. J. (2000). O₂ sensing by airway chemoreceptor-derived cells. Protein kinase C activation reveals functional evidence for involvement of NADPH oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 275; pp 7684-7692.

Osanai S., Buerk D. G., Mokashi A., Chugh D. K., y Lahiri S. (1997). Cat carotid body chemosensory discharge (*in vitro*) is insensitive to charybdotoxin. **Brain Research**. Vol. 747; pp 324-327.

Peers C. (1990). Hypoxic suppression of K⁺ currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca²⁺-activated K⁺ current. **Neuroscience Letters**. Vol. 119; pp 253-256.

Peers C. y Buckler K. J. (1995). Transduction of chemostimuli by the type I carotid body cells. **Journal of Membrane Biology**. Vol. 144; pp 1-9.

Peers C., y O'Donnell J. (1990). Potassium currents recorded in type I carotid body cells from the neonatal rat and their modulation by chemoexcitatory agents. **Brain Research**. Vol. 522; pp 259-266.

Pepper D. R., Landauer R. C., y Kumar P. (1995). Postnatal development of CO₂-O₂ interaction in the rat carotid body *in vitro*. **The Journal of Physiology**. Vol. 485; pp 531-541.

Post J. M., Hume J. R., Archer S. L., y Weir E. K. (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. **American Journal of Physiology**. Vol. 262; pp C882-C890.

Pugh C. W., Tan C. C., Jones R. W., y Ratcliffe P. J. (1991). Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 88; pp 10553-10557.

Rustenbeck I., Dickel C., Herrmann C., y Grimmsmann T. (1999). Mitochondria present in excised patches from pancreatic B-cells may form microcompartments with ATP-dependent potassium channels. **Biosci. Rep.** Vol. 19; pp 89-98.

Sakmann B., y Neher E. (1996). **Single-Channel Recording**, (2nd. ed.). New York: Plenum Press.

Salceda S., y Caro J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions: its stabilization by hypoxia depends upon redox-induced changes. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 272; pp 22642-22647.

Schneggenburger R., López-Barneo J., y Konnerth A. (1992). Excitatory and inhibitory synaptic currents and receptors in rat medial septal neurones. **The Journal of Physiology**. Vol. 445; pp 261-276.

Semenza G. L. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** Vol. 15; pp 551-578.

Stea A., Jackson A., Macintyre L., y Nurse C. A. (1995). Long-term modulation of inward currents in O₂ chemoreceptors by chronic hypoxia and cyclic AMP *in vitro*. **The Journal of Neuroscience**. Vol. 15; pp 2192-2202.

Stea A., y Nurse C. A. (1991). Whole-cell and perforated-patch recordings from O₂-sensitive rat carotid body cells grown in short- and long-term culture. **Pflügers Archives**. Vol. 418; pp 93-101.

Thompson R. J., Jackson A., y Nurse C. A. (1997). Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. **The Journal of Physiology**. Vol. 498; pp 503-510.

Ureña J., Fernández-Chacón R., Benot A. R., Alvarez de Toledo G., y López-Barneo J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca²⁺ entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 91; pp 10208-10211.

Ureña J., López-López J., González C., y López-Barneo J. (1989). Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. **The Journal of General Physiology**. Vol. 93; pp 979-999.

Wang Z., Nara M., Wang Y., y Kotlikoff M. I. (1997). Redox regulation of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in smooth muscle cells. **The Journal of General Physiology**. Vol. 110; pp 35-44.

Wang D., Youngson C., Wong V., Yeager H., Dinauer M. C., Vega-Saenz de Miera E., Rudy B., y Cutz E. (1996). NADPH-oxidase and a hydrogen peroxide-sensitive K⁺ channel may function as an oxygen sensor complex in airway chemoreceptors and small cell lung carcinoma cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 93; pp 13182-13187.

- Wasicko M. J., Sterni L. M., Bamford O. S., Montrose M. H., y Carroll J. L. (1999). Resetting and postnatal maturation of oxygen chemosensitivity in rat carotid chemoreceptor cells. **The Journal of Physiology**. Vol. 514; pp 493-503.
- Wenger R. H., Marti H. H., Schuerer-Maly C. C., Kvietikova I., Bauer C., Gassmann M., y Maly F. E. (1996). Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease-derived B-cell lines: Oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. **Blood**. Vol. 87; pp 756-761.
- Whightman R. M., Jankowski J. A., Kennedy R. T., Kawagoe K. T., Schroeder T. J., Lesczczyszyn D. J., Diliberto E. J., y Viveros O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 88; pp 10754-10758.
- Wilson D. F., Mokashi A., Chugh D., Vinogradov S., Osanai S., y Lahiri S. (1994). The primary oxygen sensor of the cat carotid body is cytochrome a3 of the mitochondrial respiratory chain. **FEBS Letters**. Vol. 351; pp 370-374.
- Wyatt C. N., y Peers C. (1995). Ca^{2+} -activated K^+ channels in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. **The Journal of Physiology**. Vol. 483; pp 559-565.
- Youngson C., Nurse C., Yeger H., y Cutz E. (1993). Oxygen sensing in airway chemoreceptors. **Nature**. Vol. 365; pp 153-155.
- Yuan X. J., Goldman W. F., Tod M. L., Rubin L. J., y Blaustein M. P. (1993). Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. **American Journal of Physiology**. Vol. 264; pp L116-L123.
- Zapata P. (1975). Effects of dopamine on carotid chemo- and baroreceptors in vitro. **The Journal of Physiology**. Vol. 244; pp 235-251.
- Zhang M., Zhong H., Vollmer C., y Nurse C. A. (2000). Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. **The Journal of Physiology**. Vol. 525; pp 143-158.
- Zhu W. H., Conforti L., Czyzyk-Krzeska M. F., y Millhorn D. E. (1996). Membrane depolarization in PC12 cells during hypoxia is regulated by an O_2 -sensitive K^+ current. **American Journal of Physiology**. Vol. 271; pp C658-C665.

RICARDO PARDAL REDONDO

SENSIBILIDAD A HIPOXIA E HIPOGLUCEMIA DE CÉLULAS
GLIÓNICAS EN RODAJAS DE CEREBRO CAROTÍDEO.

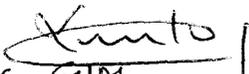
SOBRE FACILITANTE CUM LAUDE

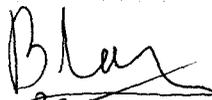
(UNANIMIDAD)

4

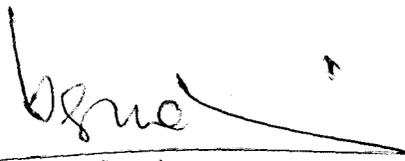
DICIEMBRE

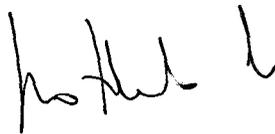
2000


DR. OVAL


DR. ~~BEDOYA~~
La Comisada.

El Vocal,
Dr. CASTELLANO
El Doctorado.


DR. SORIA


DR. TOLEDO

