



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**Cambios en la homeostasis intracelular de calcio durante
la diferenciación neuronal de células cromafines de
mamífero expuestas al factor de crecimiento nervioso.**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Q.F.B. José Nicolás Jiménez Pérez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Arturo Hernández Cruz – Instituto de Fisiología Celular

COMITÉ TUTORAL

**Dr. Luis Vaca Domínguez – Instituto de Fisiología Celular
Dr. David Erasmó García Díaz – Facultad de Medicina, UNAM**

México, D.F. Septiembre de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE GENERAL

Abstract	5
Resumen	6
Glosario	7
Introducción	8
Justificación Experimental	16
Hipótesis de Trabajo	17
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	19
Materiales y Métodos	20
Cultivos primarios de células cromafines	20
Cultivos primarios de neuronas simpáticas	21
Medios de cultivo	23
Registro de la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$)	24
Protocolos de registro	25
Análisis de los registros de la $[Ca^{2+}]_i$	26
Marcado con rianodina fluorescente	28
Microscopia confocal	28
Inmunohistoquímica	28
Captura y análisis de imágenes	29
Análisis estadístico	30
Resultados	31
Sección I: Cambios morfológicos inducidos por el NGF en células cromafines	31
Sección II: Homeostasis de calcio intracelular en condiciones de reposo	36
Sección III: Alteraciones en la magnitud y cinética de los transitorios de calcio de canales operados por voltaje en células cromafines	45
Sección IV: Alteraciones en la magnitud y en la cinética de la movilización de calcio inducida por cafeína en las células cromafines	55
Sección V: Cambios en la expresión del receptor de rianodina en células cromafines expuestas al factor de crecimiento nervioso	68
Discusión	77
Bibliografía	86
Anexo I – Artículo:	93
Modifications of intracellular Ca^{2+} signalling during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of rat adrenal chromaffin cells. Nicolás Jiménez and Arturo Hernández-Cruz. European Journal of Neuroscience. 2001, Vol. 13, pp. 1487 – 1500.	
Anexo II – Artículo:	108
Ca^{2+} -induced Ca^{2+} Release Phenomena in Mammalian Sympathetic Neurons Are Critically Dependent on the Rate of Rise of Trigger Ca^{2+} . Arturo Hernández-Cruz, Ariel L. Escobar, and Nicolás Jiménez. Journal of General Physiology. 1997, Vol. 109, pp. 147–167.	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Síntesis de catecolaminas en la medula suprarrenal.	13
Figura 2 – Protocolo de registro y ejemplo de un trazo en una neurona simpática.	26
Figura 3 – Imágenes en contraste de fases de células cromafines en cultivo.	33
Figura 4 – Imágenes en contraste de fases de células cromafines en cultivo en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF).	34
Figura 5 – Registros de calcio basal en neuronas simpáticas y en células cromafines.	37
Figura 6 – Media de la concentración basal de calcio intracelular.	39
Figura 7 – Varianza de la concentración de calcio intracelular.	41
Figura 8 – Histogramas de frecuencia de la varianza de la $[Ca^{2+}]_i$ en células cromafines en las distintas condiciones de cultivo y a los diferentes tiempos.	43
Tabla 1	44
Figura 9 – Transitorios de calcio inducidos por potasio alto (KCl 140mM), y análisis de los mismos.	47
Figura 10 – Análisis de la amplitud de los transitorios de calcio inducidos por la depolarización con potasio alto.	49
Figura 11 – Derivada y Área bajo la curva del primer transitorio de calcio.	51
Figura 12 – Constante de decaimiento (Tau) de los transitorios de calcio inducidos por depolarización.	53
Tabla 2	54
Figura 13 – Transitorios de calcio inducidos por la aplicación de cafeína.	57
Figura 14 – Analisis de la amplitud de los transitorios de calcio inducidos por la aplicación de cafeína.	58
Figura 15 – Transitorios de calcio inducidos por la aplicación de cafeína a los distintos tiempos en cultivo en el grupo tratado con el NGF.	60
Figura 16 – Derivada de los transitorios de calcio inducidos por cafeína en células cromafines bajo diversos tratamientos a los distintos tiempos en cultivo.	62
Figura 17 – Área bajo la curva de los transitorios de calcio inducidos por cafeína.	64
Figura 18 – Constante de decaimiento (Tau) de los transitorios de calcio inducidos por cafeína.	67
Tabla 3	67
Figura 19 – Expresión del receptor de rianodina en células cromafines y en neuronas simpáticas.	69
Figura 20 – Curso temporal de los cambios fenotípicos en las células cromafines en presencia del NGF.	71
Figura 21 – Expresión de los distintos subtipos del receptor de rianodina en células cromafines.	73
Figura 22 – Curso temporal de la expresión del receptor de rianodina tipo 2 en células cromafines en presencia del NGF.	75
Figura 23 – Comparación de los patrones de secreción de calcio por las pozas intracelulares y la expresión del receptor de rianodina 2.	76

ABSTRACT

Postnatal sympathetic neurons (SNs) and chromaffin cells (CCs) derive from neural crest precursors. CCs can differentiate in vitro into SN-like cells after nerve growth factor (NGF) exposure. This study examines changes of intracellular Ca^{2+} homeostasis and dynamics of CCs under conditions that promote a neuronal phenotype. Spontaneous Ca^{2+} fluctuations, a frequent observation in early cultures of CCs, diminished after > 10 days in vitro in control cells and ceased in NGF-treated ones. At the same time, Ca^{2+} rises resulting from entry upon membrane depolarization, gradually increased both their size and peak $d[\text{Ca}^{2+}]_i/dt$, resembling those recorded in SNs. Concomitantly, caffeine-induced Ca^{2+} rises, resulting from Ca^{2+} release from intracellular stores, increased their size and their peak $d[\text{Ca}^{2+}]_i/dt$ by > 1000%, and developed transient and sustained release components, similar to those of SNs. The transient component, linked to regenerative Ca^{2+} release, appeared after > 10 days of NGF treatment, suggesting a delayed steep enhancement of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR). Immunostaining showed that proteins coded by the three known isoforms of ryanodine receptors (RyRs) are present in CCs, but that only RyR2 increased significantly after NGF treatment. Since the transient release component increased more steeply than RyR2 immunostaining, we suggest that the development of robust CICR requires both an increased expression of RyRs and more efficient functional coupling among them. NGF-induced transdifferentiation of chromaffin cells involves the enhancement of both voltage-gated Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores. These modifications are likely to complement the extensive morphological and functional reorganization required for the replacement of the endocrine phenotype with the neuronal one.

RESUMEN

Las neuronas simpáticas (NS) y las células cromafines (CCs) tienen su origen en los mismos precursores de las crestas neurales. Por efecto del factor de crecimiento nervioso (FCN), las células cromafines pueden diferenciarse en células similares a las neuronas simpáticas. En el presente trabajo se estudiaron los cambios en la homeostasis intracelular de Ca^{2+} y los cambios en la dinámica de las CCs durante el proceso de diferenciación hacia un fenotipo neuronal. Las fluctuaciones espontáneas de Ca^{2+} , disminuyeron después de 10 días en las células control y en las células tratadas con el FCN. Al mismo tiempo, los incrementos de Ca^{2+} intracelular inducidos por la depolarización de la membrana plasmática, aumentaron gradualmente tanto en su amplitud como en su dinámica, reflejando una gran similitud en los observados en las NS. De manera similar, los incrementos de Ca^{2+} inducidos por la aplicación de cafeína, resultado de la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares, aumentaron su tamaño y su velocidad en más de 1000%, y desarrollaron un patrón de liberación muy similar al de las NS. El componente transitorio relacionado con la liberación de Ca^{2+} apareció después de 10 días de tratamiento con el FCN, sugiriendo un retraso en el desarrollo de los elementos que propician la amplificación de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . La inmunohistoquímica de los receptores a rianodina demostró que las tres isoformas conocidas se expresan en las CCs, pero solamente la isoforma RyR2 aumenta significativamente después del tratamiento con el FCN. A partir de que el componente de liberación transitoria se incrementó más abruptamente en las células con mayor expresión de RyR2, se propone que el desarrollo de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} requiere tanto de una mayor expresión de los receptores de rianodina así como de un acople funcional más eficiente entre estos. El FCN induce la diferenciación de las CCs, este proceso involucra un aumento en el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje así como de la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares. Es probable que estas modificaciones sean complementarias de la reorganización morfológica y funcional que se requieren para el cambio de un fenotipo endocrino a uno neuronal.

GLOSARIO

ADPRc	Adenosin Difosfato Ribosa Cíclico
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
BMP	Proteínas Morfogénicas de Hueso
Ca ²⁺	Calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de Calcio Intracelular
d[Ca ²⁺] _i /dt	Derivada de la Concentración de Calcio con respecto al tiempo
Δ[Ca ²⁺] _i	Incremento de la Concentración de Calcio
Δ[Ca ²⁺] _i *t	Área Bajo la Curva de un Transitorio de Calcio
CAF	Cafeína
CCVD	Canales de Calcio Voltaje Dependientes
CHO	Células de Ovarios de Hamster Chino
CON	Control
DEX	Dexametasona
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMEMc	DMEM completo
DOPA	Dihidroxifenilalanina
E	Epinefrina
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GATA2/3	Proteínas 2/3 de Unión al Factor de Transcripción GATA
GC	Glucocorticoides
HAND2	Factor de Transcripción Básico Helix-Loop-Helix
InsP ₃	Inositol 1,4,5-Trifostato
K ⁺	Potasio
K-R	Krebs Ringer
LCIC	Liberación de Calcio Inducida por Calcio
MASH	Homólogo de Achaetes de Mamífero
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso
NE	Norepinefrina
PBS	Buffer Fosfato-Salina
PHOX	Proteínas de Homeodominio Pareado
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
PNMT	Feniletanolamina N-Metil Transferasa
RACT	Transporte de Calcio Activado por la Liberación de Calcio
RyR	Receptor de Rianodina
SA	Simpatoadrenales
SFB	Suero Fetal Bovino
trkA	Receptor A de Tirosina Cinasa
USPHS	United States Public Health Science
VSM	Varianza Sobre la Media

INTRODUCCION

En la generación de las células del sistema nervioso de vertebrados, y en su control fenotípico, uno de los sistemas más estudiados y entendidos es el del linaje simpatoadrenal que produce neuronas simpáticas del sistema nervioso autónomo y células endocrinas. Este linaje deriva de precursores multipotenciales que se originan en las crestas neurales, provenientes del tubo neural, y que se diferencian en diversos tipos celulares.

Las crestas neurales surgen del epitelio neural en la región dorsal del tubo neural y migran a lo largo del embrión, encontrándose a todo lo largo del neuroeje embrional. Las células surgen en la interfase del ectodermo no neuronal y de la región dorsal de la placa neural, en una región referida generalmente como el borde de la placa neural. Para que se pueda llevar a cabo el proceso de inducción en las células de las crestas neurales se requiere del contacto entre el tejido de las placas neurales y la superficie del ectodermo. Una vez que surgen estas células viajan por rutas bien definidas y se acumulan en zonas específicas en donde se diferencian en una gran variedad de tipos celulares (Anderson, 1997; Vaglia, 1999; Crane, 2006).

Diferentes grupos que han estudiado la generación de los distintos tipos celulares coinciden en que aun existe controversia en el origen de dicha variabilidad quedando dos hipótesis, la primera postula que las células de las crestas neurales son pluripotentes, con la capacidad de poder dar origen a cualquier tipo celular independientemente del lugar en que se ubiquen. Mientras que la segunda menciona que existen distintos progenitores que van a definir su tipo celular final con base al lugar en donde se ubiquen y dependiendo de las señales microambientales que reciban (Knecht, 2002; Crane 2006). Por ejemplo, en el neuroeje a nivel del tronco los derivados de las crestas neurales incluyen las neuronas de la cadena de ganglios de la raíz dorsal y células satélite de los ganglios espinales y autónomos, células de Schwann, células adrenomedulares y melanocitos (Raible, 2006) mientras que en la porción cefálica las crestas neurales contribuyen no sólo con elementos del sistema nervioso periférico y central, sino también a la mayor parte del mesénquima craneofacial, cuyos derivados incluyen tejido conectivo, cartílago, hueso y dentina (Lumsden, 1989; Anderson, 1989; Le Douarin, 2007).

El sistema nervioso simpático se deriva de dos poblaciones distintas de crestas neurales, las cuales se originan a distintos niveles del eje y presentan diferencias en la regulación durante el proceso de diferenciación neuronal. El primero es el linaje simpatoentérico que se deriva de las crestas neurales rombencefálicas, de las cuales surgen el ganglio cervical superior y se hacen contribuciones al sistema nervioso entérico; y la segunda población es el linaje simpatoadrenal que se origina de la región del tronco y de este surgen la cadena de ganglios simpáticos y la medula suprarrenal. Los mecanismos que regulan el arresto y diferenciación neuronal son probablemente distintos en estos dos tipos de linajes (Anderson, 1989; Huber, 2006).

Las células de las crestas neurales que se van a desarrollar en células simpatoadrenales (SA), migran ventralmente a partir del ápice del tubo neural hacia la aorta dorsal, pasando principalmente a través de la parte posterior de las somitas. Durante esta migración dichas células son expuestas a señales que provienen de las somitas, de la porción ventral del tubo neural y del notocordio, como son las proteínas morfogénicas de hueso (BMP, por sus siglas en inglés), en particular las BMP-2, BMP-4 y BMP-7 (Huber, 2006). Una vez que arriban a la vecindad de la aorta dorsal, estas células se agregan y conforman a los ganglios simpáticos primarios (Loring, 1987). Es a partir de este punto que pueden transformarse en neuronas o células catecolaminérgicas, siendo las señales microambientales que reciben las células durante su migración las responsables que determinan si estos precursores llegarán a convertirse en neuronas simpáticas o en células cromafines (Anderson & Axel, 1986).

Por acción de las BMP en las células SA se inicia la expresión de factores de transcripción los cuales van a promover la diferenciación celular. En particular se expresan el homólogo 1 de achaetes de mamífero (MASH-1), las proteínas de homeodominio pareado Phox2a y Phox2B, así como la Hand2 y GATA 2/3 (Stanke, 2004). En estadios tempranos del desarrollo de las células SA, tanto los precursores de las células cromafines, así como los precursores de las neuronas simpáticas van a requerir de la expresión de MASH-1, pero una vez que van madurando solamente las células cromafines se tornan dependientes de la expresión de MASH-1 (Huber, 2002). MASH-1 es el encargado de activar Phox2a, un regulador positivo de las características noradrenérgicas de estas células y es indispensable para la expresión de las enzimas

que sintetizan la noradrenalina (Hirsch, 1998), sin embargo MASH-1 no es requerido para que las células SA adquieran un fenotipo neuronal.

El homeodominio Phox2b es expresado en todas las neuronas noradrenérgicas, centrales y periféricas, así como en la mayoría de las neuronas que integran los arcos reflejos autónomos. En las células SA el Phox2b se expresa de una manera independiente de MASH-1 (Pattyn, 1999) y va a actuar como un cofactor que mantiene la expresión de MASH-1, al igual que de Phox2a, el cual por sí sólo puede mantener la neurogénesis y al mismo tiempo seguir activando a Phox2b.

Con base en una visión clásica del desarrollo de las células simpatoadrenales, una vez que adquieren características de neuronas o de células catecolaminérgicas conllevan una segunda migración más allá de la aorta dorsal, para conformar los ganglios simpáticos secundarios y los ganglios paravertebrales, permaneciendo en el primordio del ganglio simpático donde pierden los marcadores cromafines, y al mismo tiempo empiezan a adquirir un fenotipo neuronal al iniciar la expresión de marcadores neuronales como son los neurofilamentos, la proteína SGD10 y la tubulina específica de neuronas, entre otros (Cochard, 1984).

En tanto que las células que continúan migrando más ventral y caudalmente dan origen al primordio de la glándula suprarrenal y pierden los marcadores neuronales, iniciando la expresión de enzimas que son requeridas para la síntesis de noradrenalina, por ejemplo la hidroxilasa de tirosina y la hidroxilasa β de dopamina (Ernsberger, 1995; Langley, 1999).

Dentro del desarrollo de las células que adoptan un fenotipo neuronal se ha sugerido que el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) juega un papel importante ya que propicia dicho fenotipo, así como la dependencia de estas células del Factor de crecimiento nervioso (NGF) (Anderson, 1993). De esta manera, se acepta generalmente que la exposición secuencial al Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y al NGF, durante el desarrollo, induce la diferenciación en una neurona simpática.

Al inicio de su diferenciación y migración las células progenitoras simpatoadrenales carecen de sensibilidad al NGF ya que no expresan el RNA

mensajero que codifica para su receptor de alta afinidad (trkA). Este receptor es un componente esencial de la señal de transducción del NGF. Se piensa que otros factores como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF; Green 1987) y la interleucina 6 (Sato, 1988) favorecen *in vivo* la expresión de receptores al NGF (Stein, 1988). El bFGF puede inducir la proliferación y el crecimiento de neuritas de las células progenitoras simpatoadrenales *in vitro*, pero es incapaz de promover su sobrevivencia a largo plazo. Esto sugiere que el FGF promueve la proliferación y la diferenciación inicial de estas células aumentando la expresión de receptores para el NGF. Posteriormente, el NGF actuaría como un factor de diferenciación y sobrevivencia. El efecto del NGF puede mimetizarse por despolarizaciones membranales.

En las células cromafines *in vitro*, el factor de crecimiento fibroblástico induce proliferación y diferenciación neuronal inicial (Claude, 1988; Stein, 1988), sin embargo una vez establecidos estos cambios tempranos, este factor es incapaz de mantener la sobrevivencia, como lo hace el NGF (Stemple, 1988).

Durante décadas se ha adoptado la idea de que los microambientes locales son los que determinan el destino final de estas células (Anderson & Axel, 1986). Con base en estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha descrito que las células SA cuando son expuestas a altas dosis de glucocorticoides, los cuales son producidos por la corteza suprarrenal, se diferencian en células cromafines. Los glucocorticoides promueven dos pasos importantes en el proceso de diferenciación celular: 1) la supresión de los marcadores neuronales y 2) la inducción de la enzima responsable de la síntesis de la adrenalina, la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) (Unsicker, 1978; Doupe, 1985).

En 1985 Doupe demostró que las células cromafines *in vitro* expuestas al NGF por varios días se transformaban en células morfológica y antigénicamente indistinguibles de verdaderas neuronas simpáticas (Doupe, 1985; Unsicker, 1978). Este proceso constituye un ejemplo de transdiferenciación, fenómeno en el cual ocurre un cambio fenotípico por cambios en la programación genética de las células, sin que para ello sea necesaria la síntesis de DNA o división celular. Las transformaciones que se llevan a cabo durante la transdiferenciación celular pueden en algunos casos ser en forma estable o irreversible, en ocasiones desaparecen totalmente las características de las células originales, sin que por ello se considere a las células resultantes como

anormales (Okabe, 1991). En el caso de las células cromafines, el NGF induce primeramente división celular y posteriormente la formación de neuritas (Lillien, 1985). Estos efectos se clasifican dentro de los efectos tempranos y tardíos, respectivamente de este factor. La conversión al fenotipo neuronal es inducida por genes específicos de neuronas y la síntesis de novo de proteínas (Anderson, 1986). Los efectos del NGF sobre las células cromafines pueden manifestarse incluso en células de animales adultos (Tischler, 1993). Una evidencia a favor del modelo de la diferenciación neuronal de las células cromafines por el NGF lo constituyen experimentos en los cuales se les inyectó crónicamente NGF a ratas preñadas. Este procedimiento indujo en los embriones el reemplazo de las células cromafines por neuronas simpáticas (Aloe, 1979). Estos estudios sugieren que el NGF es una de las señales ambientales de mayor importancia *in vivo* en el control de la diferenciación neuronal de las células de linaje simpatoadrenal. Todos los efectos mencionados sugieren fuertemente que el NGF es indispensable para la diferenciación y sobrevivencia de las células simpatoadrenales tanto *in vivo* como *in vitro*.

En contraste, cuando las células cromafines se encuentran expuestas a un ambiente rico en glucocorticoides (GC), similar al que se encuentra en la medula de la glándula suprarrenal, estas células expresan el fenotipo cromafin (Anderson, 1993). De esta observación se deriva que en el momento de hacer cultivos de células cromafines es importante adicionarles GCs (p.ej. dexametasona) para que dichas células mantengan el fenotipo cromafin, ya que en caso de no hacerlo un porcentaje de la población de las células en cultivo tenderán a adquirir el fenotipo neuronal de manera espontánea (Doupe, 1985)

Una vez diferenciados estos dos tipos celulares pueden ser fácilmente distinguibles: las células cromafines son pequeñas ($\approx 15\text{--}20\ \mu\text{m}$ de diámetro), comparadas con las neuronas simpáticas, con escaso citoplasma y poco retículo endoplásmico rugoso, tienen un núcleo que ocupa gran parte del citoplasma, con un sólo nucleolo que es muy evidente, y que se posiciona excéntricamente en la célula, están deprivadas de procesos, secretan principalmente adrenalina y sus vesículas son de 150-350 nm de diámetro (Livett, 1984; Doupe, 1985). La síntesis y posterior secreción de la adrenalina por parte de las células cromafines se debe principalmente a la presencia de la enzima PNMT, la cual es la responsable de llevar a cabo el último

paso en la biosíntesis de esta catecolamina, transformando la noradrenalina en adrenalina, esto es, adicionando un grupo metilo a la amina posicionada en el carbono α de la molécula (Livett, 1984).

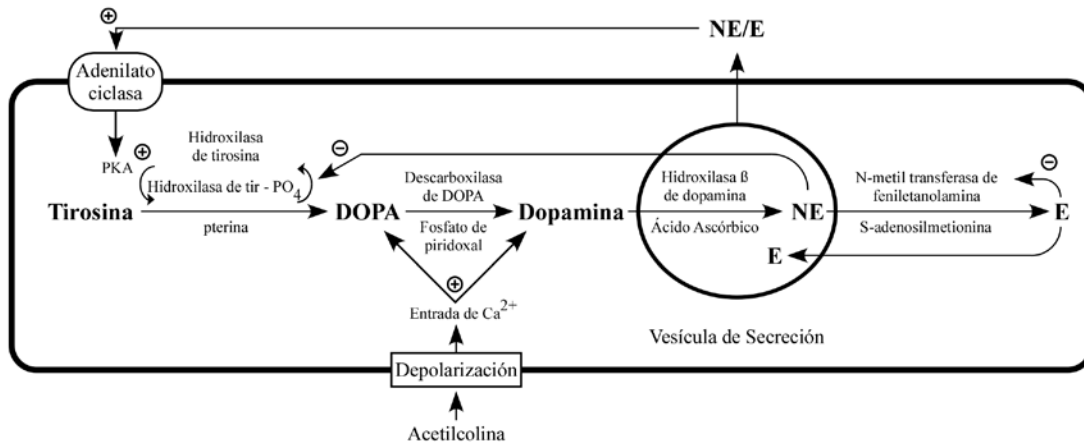


Figura 1. Síntesis de Catecolaminas en la médula suprarrenal. DOPA, Dihidroxifenilalanina; E, Epinefrina; NE, Norepinefrina; PKA, Proteína cinasa dependiente de AMPc. (Tomado de: Bolander, F.F. 2004.)

En contraste, las neuronas simpáticas son células mas grandes (40-50 μ m), presentan un núcleo pequeño con respecto del tamaño de la célula, el cual se encuentra generalmente en el centro de la misma, presentan procesos dendríticos y axonales con abundantes microtúbulos y neurofilamentos, y secretan primordialmente noradrenalina siendo sus vesículas en promedio de 50 nm de diámetro (Doupe, 1985).

Respecto de la homeostasis intracelular de calcio, podemos decir que la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ en las neuronas simpáticas es un proceso de suma importancia ya que de ello dependen los diferentes destinos a los que se pueden dirigir dichas células, por ejemplo, el calcio puede servir como una señal de migración neuronal (Komuro, 1992; 1996), mantener la sobrevivencia neuronal (Collins, 1991; Larmet, 1992; Finkbeiner, 1996; Distasi, 1998), inducir la diferenciación neuronal (Finkbeiner, 1996; Gu, 1997), o bien participar en la muerte celular programada (Dowd, 1995), ya sea induciéndola (Trump, 1992; Keller, 1998; Lipton, 1998) o evitándola (Franklin, 1994; Lampe, 1995; Schubert, 1997). Esta diversidad de funciones hace del calcio una señal

clave para las neuronas, y es por esta razón que se encuentra regulada por estrictos mecanismos de control (Kostyuk, 1994), los cuales van a actuar a diferentes niveles, haciendo que esta regulación presente patrones característicos de la $[Ca^{2+}]_i$.

En el caso de las neuronas el calcio se mantiene bajo (50-100 nM) y estable, sin presentar oscilaciones espontáneas. Ante una despolarización el aumento de calcio es rápido, transitorio y disminuye rápidamente. Si se induce experimentalmente la liberación de calcio de las pozas intracelulares, esta presenta un patrón de aumento de calcio formado por dos componentes, un aumento inicial rápido en forma de espiga, seguido por la liberación sostenida en forma de meseta. Este patrón se presenta siempre y cuando los reservorios se encuentren completamente llenos, si se encuentran parcialmente llenos sólo se observa la liberación en forma de meseta. Analizando la liberación de calcio de las pozas intracelulares, y apoyados en otros trabajos con el receptor de rianodina tipo 2 Hernández-Cruz y col. (Hernández-Cruz, 1997) postulan que esta liberación de calcio corresponde al tipo descrito como “liberación de calcio inducida por calcio”, el cual es propio de los receptores de rianodina tipo 2, por lo que se deduce que las neuronas simpáticas expresan este receptor.

En el caso de las células cromafines la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ presenta características diferentes a las neuronas simpáticas. Estas células presentan variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ debido a que oscilan de manera espontánea (D'Andrea, 1995; 1996), sin que hasta el momento este claro el papel fisiológico de dichas oscilaciones. Referente a la función del calcio intracelular este se ha relacionado primordialmente con los procesos de secreción del contenido de los gránulos cromafines (Ungar, 1983; Aunis, 1998) y en menor medida como un segundo mensajero o una señal intracelular (Aunis, 1998; Ohta, 1998). De los receptores intracelulares que liberan calcio se ha reportado que en la medula suprarrenal se expresan los tres tipos de receptores a rianodina (Giannini, 1995), observándose un patrón de liberación de calcio formado por un aumento discreto y una disminución constante, aun en presencia del secretagogo (Liu, 1991).

El proceso por el cual una célula diferenciada se transforma en otra con un fenotipo diferente se conoce como transdiferenciación (Anderson, 1989) y en el caso de las células cromafines el NGF induce la transdiferenciación en un fenotipo similar al de

las neuronas simpáticas (Doupe, 1985), el cual incluye cambios morfológicos caracterizados por la generación de neuritas, la formación de vesículas simpáticas pequeñas, un aumento en el tamaño del soma, así como un incremento en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso y del tamaño del aparato de golgi, aunque no desaparecen completamente algunas características de la célula cromafin (Doupe, 1985; Patterson, 1990; Anderson, 1993). Durante esta transdiferenciación también hay cambios a nivel bioquímico (Doupe, 1985; Pandiella-Alonso, 1986) y a nivel electrofisiológico (Islas-Suarez, 1994, Drucker-Colin, 1994). Sin embargo, no existen reportes respecto de la homeostasis y dinámica intracelular de calcio, el cual puede estar jugando un papel muy importante en la fisiología de dichas células.

JUSTIFICACION EXPERIMENTAL

El origen embriológico de las células simpatoadrenales nos indica que dichas células al tener un origen común comparten varias características tanto morfológicas como fisiológicas, y a pesar de esto, por efecto de las señales químicas que reciben se van a diferenciar en células del sistema nervioso o bien en células cromafines, dos grupos de células con características muy distintas entre si; mientras unas se agrupan en la cadena de ganglios simpáticos secretando neurotransmisores cuya función es regular y transmitir mensajes provenientes y hacia el sistema nervioso, las otras van a llevar a cabo funciones propias y características de las células secretoras del sistema endocrino, considerablemente distintas a las neuronas simpáticas.

Las investigaciones que se han llevado a cabo para estudiar los procesos o mecanismos por los cuales las células cromafines pueden transdiferenciarse a neuronas simpáticas, por efecto del NGF, se han enfocado principalmente en las modificaciones que se presentan a nivel morfológico, dando poca importancia al aspecto fisiológico, presentándose pocas publicaciones que abordan el papel funcional de dicha transformación.

Al ser las células cromafines y las neuronas simpáticas células que llevan a cabo, primordialmente, procesos de secreción de hormonas y/o neurotransmisores es de vital importancia el papel que juega el calcio al interior de las mismas y la forma en como dichas células controlan y regulan la concentración intracelular de este catión, encontrándose diferencias muy importantes entre unas y otras. Es por ello que resulta de suma importancia estudiar, mas allá de un simple cambio morfológico, los cambios en la homeostasis y dinámica del calcio intracelular en las células cromafines y si estos cambios durante el proceso de neurogenización son concordantes a la adquisición de un patrón de homeostasis similar al de las neuronas simpáticas, permitiéndole a las células cromafines neurogenizadas regular su dinámica de calcio intracelular de una manera similar a estas neuronas.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Las células cromafines durante el proceso de neurogenización modifican su homeostasis y dinámica de calcio intracelular de manera acorde con otros cambios fisiológicos que culminan con una expresión fenotípica que se asemeja o es indistinguible de las neuronas simpáticas.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las modificaciones en la homeostasis y en la dinámica de calcio intracelular que se presentan paulatinamente en las células cromafines durante su neurogenización por efecto de la exposición al factor de crecimiento nervioso (NGF).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer en cultivos primarios el modelo de neurogenización *in vitro* de células cromafines en neuronas simpáticas por exposición al NGF.
- Estudiar los posibles cambios espontáneos de la concentración intracelular de calcio en células cromafines control, neurogenizadas *in vitro* y en neuronas simpáticas verdaderas en condiciones de reposo.
- Estudiar los aspectos cinéticos de la entrada de calcio en células cromafines control, neurogenizadas *in vitro* y en neuronas simpáticas verdaderas por despolarización de la membrana.
- Estudiar la dinámica de liberación de calcio desde pozas intracelulares de calcio en células cromafines control, neurogenizadas *in vitro* y en neuronas simpáticas verdaderas.
- Identificar los elementos básicos responsables de la homeostasis y dinámica de calcio intracelular en las células cromafines durante el proceso de neurogenización en comparación con los de las neuronas simpáticas.

MATERIALES Y METODOS.

CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS CROMAFINES.

Todos los estudios con animales se realizaron bajo un protocolo institucionalmente aceptado similar a la Guía de USPHS para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Se trabajó con ratas de la cepa Wistar las cuales se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, en donde se mantenían en un régimen normal de 12 horas luz-oscuridad, con libre acceso al alimento y al agua.

Los cultivos de las células cromafines se realizaron de acuerdo con técnicas ya establecidas (Unsicker, et. al. 1989) con pequeñas adecuaciones de acuerdo a las necesidades del proyecto. Para llevar a cabo el cultivo primario de células cromafines de mamífero se utilizaron ratas macho con 10 días de edad, las cuales son procesadas en un periodo no mayor a dos horas después de haber sido separadas de la madre, esto con el fin de disminuir cualquier tipo de estrés o sufrimiento en los animales. Uno a uno se colocan en una cámara con éter hasta que se encuentran anestesiados, se retiran de ésta y se limpian profusamente con una solución de etanol al 70%.

Para extraer las glándulas suprarrenales los animales anestesiados se colocan en posición ventral en una tabla de disección, previamente esterilizada, y se les hace una incisión longitudinal paravertebral en la piel, desde la pelvis hasta las costillas. Utilizando un segundo equipo de disección se hace un corte sobre la capa muscular, con el cual se deja al descubierto la glándula suprarrenal. Una vez que se visualiza se hacen los cortes necesarios para retirar el tejido conectivo y se separa la glándula del riñón, se repite el procedimiento para la glándula contralateral. Una vez extraídas se colocan en medio Hanks. Todo el material quirúrgico que se utiliza durante las cirugías es previamente esterilizado.

Posteriormente a que se extraen las glándulas suprarrenales de los animales se retira la cápsula de tejido que las cubre y la corteza de la glándula utilizando un microscopio de disección y se van colocando en un tubo cónico de 15 ml con medio Hanks fresco (10 ml), se centrifugan por 5 min a 800 rpm y se retira el sobrenadante. El

tejido resultante, la medula de la glándula suprarrenal, se resuspende en 10 ml de Hanks, adicionados con colagenasa tipo I a una concentración de 1.0 mg/ml; y 20 µg/ml de DNAsa tipo I. Se incuba por 20 min a 37°C con agitación continua, transcurrido este tiempo el tejido se centrifuga por 10 min a 1000 rpm y se retira el sobrenadante, se adicionan 10 ml de medio Hanks y se resuspende el tejido con una pipeta pasteur pulida y siliconizada. Se pone el tubo a 37°C con agitación por 5 min, al final de ésta incubación se centrifuga de nuevo por 10 min a 1000 rpm, y se retira el sobrenadante, se lava dos veces mas con Hanks, después del último lavado se adicionan 2 ml de medio Hanks y se disocia el tejido mecánicamente con una pipeta pasteur pulida y siliconizada, se centrifuga por 5 min a 1000 rpm y se retira el sobrenadante. El botón celular se resuspende en 0.5 ml de Hanks, se cuantifica la densidad celular y se diluye a una concentración de 10^4 - 10^5 células/100 µl con medio Hanks. Las células cromafines se siembran colocando 100 µl de la suspensión celular sobre cubreobjetos redondos del No. 1, previamente lavados, esterilizados y forrados con poli-L-lisina (100 µg/ml), se dejan sedimentar por 30 min para que se adhieran al vidrio forrado y se les adiciona 1.0 ml de medio de cultivo DMEM completo.

CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS SIMPATICAS.

Los cultivos de neuronas simpáticas se realizaron de acuerdo con protocolos ya establecidos (Johnson and Argiro, 1983) con pequeñas adecuaciones de acuerdo a las necesidades del proyecto. Para llevar a cabo el cultivo primario de neuronas simpáticas de mamífero se utilizaron ratas macho con 10 días de nacidos, las cuales son procesadas en un periodo no mayor a dos horas después de haber sido separadas de la madre, esto con el fin de disminuir cualquier tipo de estrés o sufrimiento en los animales. Uno a uno se colocan en una cámara con éter hasta que se encuentran anestesiados, se retiran de ésta y se limpian profusamente con una solución de etanol al 70%.

Para la extracción del ganglio cervical superior los animales ya anestesiados se colocan en una tabla de disección estéril en posición dorsal, el tórax y la cabeza se aseguran con agujas de disección procurando que el cuello quede con la mayor extensión posible. Con un bisturí se hace una incisión en la línea media del cuello,

desde la base de la garganta hasta el mentón, y la piel se desplaza hacia los costados haciendo dos cortes laterales, uno rostral al cuello y otro a la altura de las clavículas. Se remueven las glándulas submandibulares y se deja expuesta la capa muscular. Los pasos subsecuentes se hacen con ayuda del microscopio de disección. Se hace un corte en la base del músculo esternocleidomastoideo, cerca de la clavícula, y se desplaza a un costado. A continuación el músculo omohioideo se corta en su porción medial y es desplazado a ambos lados del corte. En este punto ya se pueden ver claramente la bifurcación de la arteria carótida y el nervio vago, el ganglio nodoso también es visible, el cual se encuentra lateral a la bifurcación de la arteria carótida, pero a un nivel más profundo. El ganglio cervical superior se localiza justo por debajo de la bifurcación de la carótida y se puede observar haciendo un desplazamiento lateral de dicha arteria. La remoción del ganglio cervical se puede hacer por dos vías: en la primera puede ser extraído con una disección directa, para ello se hace la disección de la arteria carótida, del músculo dorsal al ganglio y del tejido circundante, entonces el ganglio puede ser removido haciendo cortes en sus extremos rostral y caudal. De manera alterna se puede hacer la remoción completa del ganglio junto con el nervio vago y la arteria carótida como un conjunto, y posteriormente hacer la disección del ganglio de los otros tejidos. Para la extracción del ganglio contra lateral se efectúa el mismo procedimiento. Una vez extraídos los ganglios se colocaban en medio Hanks. Todo el material quirúrgico que se utiliza durante las cirugías es previamente esterilizado.

Una vez extraídos los ganglios se limpian del tejido conectivo circundante utilizando un microscopio de disección y se cortan en 5 o 6 segmentos cada uno, se colocan en un tubo cónico de 15 ml con medio Hanks fresco y se centrifugan a 800 rpm por 5 min, se retira el sobrenadante y se resuspenden en 10 ml de Hanks adicionado con 1 mg/ml de tripsina y 20 µg/ml de DNAsa, dejándose en ésta solución por 30 min a 37°C con agitación continua. Posteriormente el tejido se centrifuga por 10 min a 1000 rpm, se extrae el sobrenadante y se trata el tejido con inhibidor de tripsina (2 µg/ml) en 10 ml de DMEMc, se deja incubar por 5 min a 37°C, se centrifuga a 1000 rpm por 10 min y se retira el sobrenadante. Por último se le adiciona al tejido 10 ml de Hanks con colagenasa tipo I (1.0 mg/ml) y DNAsa (20 µg/ml), por 20 min a 37°C y agitación continua. Pasado el tiempo de incubación se centrifuga y se retira el sobrenadante con la enzima, se lava el tejido dos veces con Hanks y se centrifuga a 1000 rpm por 10 min

en cada una de ellas. Finalmente se disocia el tejido mecánicamente con una pipeta pasteur pulida y siliconizada en 2.0 ml de Hanks, se centrifuga y se resuspende en 0.5 ml de medio Hanks, se cuantifica la densidad celular y se diluye a una concentración de 10^4 - 10^5 células/100 μ l. Las neuronas simpáticas se siembran colocando 100 μ l de la suspensión celular sobre cubreobjetos redondos del No. 1, previamente lavados, esterilizados y forrados con poli-L-lisina (100 μ g/ml), se dejan sedimentar por 30 min para que se peguen al vidrio forrado y se les adiciona 1.0 ml del medio de cultivo DMEM completo.

MEDIOS DE CULTIVO.

El medio de cultivo utilizado fue el Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), complementado con: 10% de suero fetal bovino; 80nM de Insulina; 10,000 U de penicilina C; y 10,000 μ g de sulfato de estreptomicina, en un volumen de 100 ml. Este medio se denomina como DMEM completo (DMEMc) y se utilizó tanto para el cultivo de células cromafines como de neuronas simpáticas.

En el caso particular de las células cromafines se emplearon tres condiciones experimentales:

- a) Grupo Control (**CON**): células únicamente con DMEMc.
- b) Grupo Dexametasona (**DEX**): células en cultivo con DMEMc más dexametasona (5 μ M).
- c) Grupo Factor de Crecimiento Nervioso (**NGF**): células en cultivo con DMEMc más factor de crecimiento nervioso (100 ng/ml).

Para el cultivo de las neuronas simpáticas se utilizó el DMEMc como medio base y se adicionó con el factor de crecimiento nervioso a una concentración de 20 ng/ml, la utilización del NGF en este caso fue únicamente con la finalidad de mantener la sobrevivencia de las neuronas simpáticas, ya que si se cultivan en DMEMc sin el NGF las neuronas simpáticas no sobreviven mas de 3 días en cultivo y con un deterioro muy evidente.

En todos los cultivos y condiciones experimentales el medio se cambia cada 48 hrs.

REGISTRO DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO ($[Ca^{2+}]_i$).

Para el registro de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$, se toma el vidrio en donde se sembraron las células y se coloca en una cámara de registro donde se incuba con el medio de perfusión (Krebs-Ringer) adicionado con el indicador fluorescente Fura2-AM, a una concentración de 2.0 μ M por 1 hr. a 37°C (Connor, 1986). Una vez transcurrida la incubación se coloca la cámara en el microscopio y se conecta a un sistema de perfusión continua, en donde se lava con una solución de Krebs-Ringer (K-R) con la siguiente composición (mM): NaCl 145.0; KCl 3.0; $MgCl_2$ 2.0; $NaHCO_3$ 1.0; NaH_2PO_4 0.5; Hepes 5.0; $CaCl_2$ 2.0; y glucosa 5.0 (pH = 7.4 y 300mOsm).

Los registros se realizaron en un microscopio invertido Nikon Diaphot con un objetivo de 100X de inmersión en glicerol (A.N. = 1.3). Para excitar el fluoróforo se emplearon dos láseres de nitrógeno acoplados al microscopio por una fibra óptica bifurcada. La fluorescencia emitida por el fluoróforo es captada por una cámara CCD acoplada a un intensificador y las imágenes son enviadas a un procesador analógico-digital, de ahí a una computadora donde se visualiza la intensidad de emisión de la fluorescencia y al mismo tiempo se capturan estos datos con la ayuda del programa FluoLab 2.06. En todos los registros la frecuencia de captura de las imágenes fue de 2.5 Hz, la frecuencia y alternancia de disparo de los láseres también son controladas por el programa FluoLab.

El análisis de la $[Ca^{2+}]_i$ se basa en la capacidad del fluoróforo de ser excitado a dos longitudes de onda dependiendo si se encuentra unido a calcio (340 nm) o en su forma libre (380 nm) respondiendo a una u otra y emitiendo a 510 nm. El método para calcular la $[Ca^{2+}]_i$ se basa en el procedimiento descrito por Grynkiewicz (1985) y Tsien (1990). Para calcular la concentración intracelular de calcio se utilizó la siguiente ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * \beta * \frac{R_{max} - R}{R - R_{min}}$$

En donde K_d es la constante de disociación del complejo Fura2 – Ca^{2+} (240 nM); β es el cociente de la intensidad a 380 nm en cero calcio y la intensidad a 380 nm en una concentración máxima de calcio (39.8 μ M Ca^{2+}); R_{max} es el cociente de la intensidad de 340/380 a una concentración máxima de calcio (39.8 μ M Ca^{2+}); R_{min} es el cociente de la intensidad de 340/380 en una solución con cero calcio; y R es el valor del cociente de la intensidad de 340/380 en cada uno de los puntos de la gráfica de los registros, este dato se obtiene directamente del programa Fluolab 2.06.

Para la aplicación de las sustancias con que se estimula a las células se emplearon micropipetas de borosilicato colocadas a una distancia aproximada de 200 μ m de la célula en registro, las cuales eyectarán el fluido por la aplicación de 10-15 psi de presión.

Las sustancias que se aplicaron a las células durante los registros son:

- a) KCl 140.0 mM (en una solución con 10mM de HEPES y 2mM de $CaCl_2$, pH = 7.4).
- b) Cafeína 10.0 mM (en K-R, pH = 7.4).

PROTOCOLOS DE REGISTRO.

Para medir la $[Ca^{2+}]_i$ basal se registraron a las células durante cinco minutos de manera continua, con el fin observar las variaciones espontáneas del calcio intracelular en condiciones de reposo.

Para los registros de la $[Ca^{2+}]_i$ en células estimuladas se aplicó el siguiente protocolo: se inicia el registro y se dejan 2.0 min de registro basal, transcurrido este tiempo se aplican 3 pulsos de KCl con una duración de 400 mseg. cada uno y con un intervalo de 30.0 seg. entre cada pulso, después del último pulso se deja un lapso de 2.0 min, seguido por la aplicación de cinco pulsos de cafeína, los cuales tendrán una duración de 30.0 seg. y un intervalo de 2.0 min entre cada uno de ellos (fig 2).

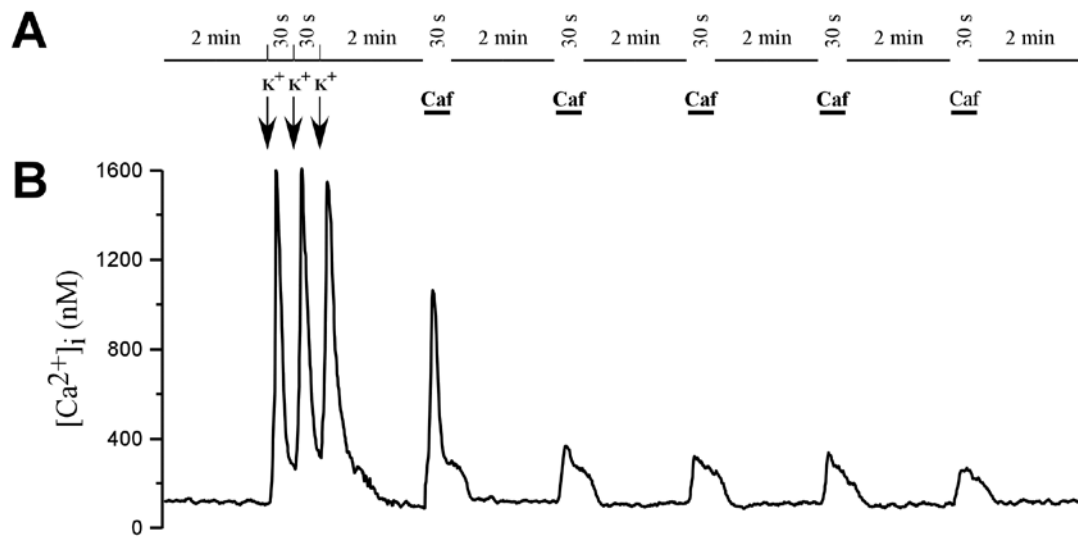


Figura 2. Protocolo de registro y ejemplo de un trazo en una neurona simpática. A, Esquema del protocolo de registro aplicado a cada una de las células registradas, en la barra se puede observar el curso temporal de cada una de las aplicaciones y la sustancia que se aplicó. B, Ejemplo del registro obtenido en una Neurona Simpática después de la aplicación del protocolo mostrado en A. (K^+ , KCl 140 mM por 400 ms; Caf, cafeína 10 mM por 30 s).

ANÁLISIS DE LOS REGISTROS DE LA $[Ca^{2+}]_i$.

Con base en los registros mencionados anteriormente se procedió a efectuar el siguiente análisis:

- 1.- Con los datos obtenidos de los registros de las células en reposo se calculó la media aritmética de la concentración basal de calcio, así como la varianza de los datos durante el tiempo de registro.
- 2.- En el análisis de los transitorios de calcio inducidos por la aplicación de KCl se obtuvieron los siguientes datos:
 - a) Amplitud del transitorio de calcio: valor máximo del aumento de calcio después de la aplicación del KCl, menos el valor de la basal de calcio, tomado de la media aritmética de la misma célula.

- b) Primera derivada del transitorio de calcio: se calculó la derivada de todo el transitorio, punto por punto, y se tomó el punto máximo de la derivada como el cambio máximo de la concentración de calcio intracelular con respecto al tiempo ($d[Ca^{2+}]/dt$, nM/seg).
- c) Área bajo la curva: se calculó la integral del transitorio de calcio, en un lapso de 20 seg. a partir de la aplicación del KCl, a este valor se le restó el valor correspondiente al área de la basal durante el mismo período de tiempo.
- d) Constante de tiempo de recuperación de la concentración de calcio intracelular (τ). Para calcular esta constante, se tomó la curva de decaimiento del transitorio de calcio inducido por potasio y se le hizo el ajuste de una función exponencial simple.

3.- Con la medición de los transitorios de calcio inducidos por cafeína se obtuvieron los siguientes datos:

- a) Amplitud de la respuesta de calcio: valor máximo de la concentración de calcio después del pulso de cafeína, menos el valor de la basal de calcio, tomado de la media aritmética de la misma célula.
- b) Primera derivada de la concentración de calcio con respecto al tiempo.
- c) Área bajo la curva de la respuesta de calcio después de la aplicación de cafeína (estas dos últimas fueron calculadas de la misma forma que en el caso de la respuesta inducida por potasio).
- d) Constante de tiempo de recuperación de la concentración de calcio intracelular (τ). Para calcular esta constante se tomó la curva de decaimiento de la espiga de calcio inducida por cafeína y se le hizo el ajuste de una función exponencial simple. Este análisis se llevó a cabo únicamente en las células con NGF a los 15 días y en las neuronas simpáticas, ya que fueron

las únicas en presentar un transitorio significativo que nos permite hacer este tipo de análisis.

MARCADO CON RIANODINA FLUORESCENTE.

Para el estudio de la presencia del receptor de rianodina en células cromafines y en neuronas simpáticas se utilizó una rianodina marcada con fluoresceína de la compañía Molecular Probes, BODIPY-FL-X Rianodina. Las células fueron incubadas en total oscuridad a 22°C en Krebs-Ringer con el fluoróforo a una concentración de 1µM durante 45 min Posterior a la incubación las células fueron lavadas exhaustivamente con Krebs-Ringer para remover la rianodina fluorescente, que no se unió al receptor, terminados los lavados las células fueron montadas en una cámara de registro para ser analizadas con un sistema de microscopia confocal, cabe mencionar que los registros de estas células no rebasaron un tiempo límite de 30 min

MICROSCOPIA CONFOCAL

Las imágenes confocales de las células marcadas con la rianodina fluorescente fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal de barrido láser (Bio-Rad MRD 1024), equipado con un láser de Kriptón/Argón. Este sistema confocal se encuentra adaptado a un microscopio invertido Nikon (Diaphot 300), para las observaciones se utilizó un objetivo de 100X de inmersión en glicerol con una apertura numérica de 1.3 (Nikon). Los parámetros que se utilizaron fueron los siguientes: excitación 488 nm; emisión 522 nm; apertura de iris de 2.5 a 2.7; ganancia: 1000 y una potencia de láser de 1%. Estos parámetros se mantuvieron constantes en todas las condiciones estudiadas.

INMUNOHISTOQUÍMICA.

Los cubreobjetos de vidrio con las células cromafines o neuronas en cultivo, en las diferentes condiciones y a los tiempos indicados, se lavaron dos veces con una solución de buffer fosfatos-salina (PBS, 0.01 M y 0.09%, respectivamente) y se fijaron con paraformaldehído al 4.0% en PBS por 30 min a temperatura ambiente, se lavan de

nuevo con PBS y se incuban con la solución de bloqueo y permeabilización (leche descremada al 10% en PBS con Tritón X-100 al 0.1% (v/v)) por 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente los cubreobjetos con las células se lavan y se incuban con los anticuerpos primarios (diluidos 1:100 en PBS) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda, después de esta incubación se lavan de nuevo las muestras y se incuban con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón, dilución 1:50), el cual se encuentra acoplado a un fluoróforo (isotiocianato de fluoresceína, FITC), durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se lavan de nuevo con PBS y se montan los cubreobjetos en portaobjetos de vidrio empleando un medio para montar muestras con fluorescencia, manteniéndose a 4°C hasta el momento de su análisis. Los controles negativos fueron preparados incubando los cultivos con: a) únicamente el anticuerpo primario; b) sólo con el anticuerpo secundario; y c) células cromafines que no recibieron ningún tratamiento. Como se esperaba estos cultivos no mostraron fluorescencia por arriba de la fluorescencia basal (auto fluorescencia) determinada al observar el tercer grupo de los controles negativos. Los anticuerpos primarios contra epítopes específicos de los tres subtipos del receptor de rianodina fueron amablemente proporcionados por el Dr. Anthony Lai de la Universidad de Wales en el Reino Unido.

CAPTURA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.

Para la captura de las imágenes de las células marcadas se utilizó un sistema de microscopia de epifluorescencia. La iluminación se consiguió mediante una lámpara de mercurio de 100W montada en un microscopio invertido Nikon Diaphot, utilizando un objetivo 60X de inmersión en aceite (A.N. = 1.4), y una combinación de los siguientes filtros: un filtro de excitación en el rango de 450-490 nm, un espejo dicroico que únicamente permite el paso de la fluorescencia emitida a 510 nm y un filtro barrera de 520 nm. Las imágenes se adquirieron con una cámara CCD enfriada de alta sensibilidad y linealidad (resolución de 16 bits). La iluminación de las muestras se limitó a un tiempo de exposición fijo (0.25 seg.) para todas las muestras, regulado a través de un obturador electrónico controlado por el mismo programa que se utilizó para la captura de imágenes, Image Pro Plus. Las imágenes capturadas en formato FITS sin comprimir se convirtieron a imágenes en formato TIFF (8 bits) y se guardaron para analizarlas posteriormente con el programa Image Pro Plus. Para el análisis de la

intensidad de la fluorescencia en las células se determinó un área de interés, utilizándose en todos los casos un círculo con un diámetro equivalente a 5 micras del cual se obtiene la fluorescencia promedio. Las medidas de intensidad de fluorescencia se obtienen al poner este círculo en una región del citoplasma (no nuclear) de cada una de las células que se analizan, así como en 3 áreas libres de células en el cubreobjetos (fluorescencia de fondo). La fluorescencia de fondo de cada campo se substrajo de las intensidades de fluorescencia de cada una de las células medidas en el mismo campo, dando como resultado la fluorescencia corregida para cada una de las células (fluorescencia específica).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa Statview 4.5. Las comparaciones que se realizaron fueron de análisis de varianza factorial de dos vías (ANOVA). Las diferencias significativas reportadas son con base en la prueba *Post Hoc* de *Fisher*. Todos los datos son reportados como la media \pm error estándar.

RESULTADOS

Sección I: Cambios morfológicos inducidos por el NGF en células cromafines.

Con base en lo propuesto en los objetivos del presente trabajo, uno de los primeros pasos es determinar si con nuestro modelo experimental podemos inducir la neurogenización de las células cromafines en cultivo por la adición del factor de crecimiento nervioso. Este modelo ya ha sido ampliamente reportado (Doupe, et. al., 1985), sólo nos resta comprobar si con nuestras condiciones de trabajo es posible replicarlo.

De acuerdo con lo presentado en materiales y métodos, los cultivos son sometidos a las tres condiciones experimentales.

Las células del grupo control (CON) son mantenidas en cultivo sólo en presencia del DMEM completo sin ningún otro aditamento, esto con la finalidad de observar si el suero fetal bovino, con el que se prepara el DMEMc, ejerce algún efecto sobre dichas células. Como se puede apreciar en la figura 3 (panel superior) las células del grupo control no presentan cambios importantes durante los quince días que permanecieron en cultivo manteniendo su fenotipo celular en la mayoría de los casos: células redondas con un diámetro de 15 a 20 μm , el núcleo ocupa del 60 al 80% del espacio intracelular, nucleolo es fácilmente visible y carecen de procesos citoplásmicos.

Es importante señalar que en varios trabajos se ha reportado que estas células al no estar expuestas a los glucocorticoides provenientes de la corteza suprarrenal tienden a experimentar un proceso de neurogenización espontánea (Anderson, 1986), en este trabajo también se encontraron dichos eventos (fig 3). El proceso de neurogenización espontánea de estas células se presenta de formas muy variadas, pero dentro de estas hay dos patrones que son de los más constantes, en el primero dichas células pueden aumentar su tamaño (aprox. 30-40 μm) y seguir manteniendo su fenotipo similar a las células cromafines y en el segundo caso se observa que estas células empiezan a adoptar un fenotipo neuronal pero no cambian de manera significativa su tamaño (fig 3). Se puede pensar en un tercer patrón en donde las células

aumentan su tamaño y adoptan el fenotipo neuronal, pero esta combinación se encuentra muy esporádicamente en los cultivos de 15 días en DMEMc. Otro punto importante a mencionar es que este proceso de neurogenización espontánea involucra un curso temporal muy diferente al presentado por las células tratadas con el NGF. En las células expuestas al NGF en cultivo en quince días se observa un fenotipo neuronal prácticamente indistinguible de las neuronas simpáticas, mientras que en las células cromafines el proceso de neurogenización espontánea es mucho más lento ya que a los quince días en cultivo sólo se observa una neurogenización parcial, ya sea en el tamaño o en los procesos. En un intento de establecer una comparación podríamos decir que estas células equivalen a las células con NGF, pero a un tiempo de 7 a 10 días en cultivo, o incluso menor. Otro dato importante a mencionar es que en estos cultivos el porcentaje de células que presentan este proceso de neurogenización espontánea es reducido, de una manera cualitativa podríamos decir que no va más allá del 15% de la población celular en el cultivo.

En un segundo grupo se trató a las células en cultivo con el glucocorticoide dexametasona (5 μ M), esto con la intención de reproducir el microambiente químico en el que se encuentran las células cromafines en la medula suprarrenal, en donde están expuestas a una alta concentración de glucocorticoides secretados por la corteza suprarrenal, y con ello puedan mantener su fenotipo cromafin (Doupe, 1985). En este grupo se encontró que después de 15 días en cultivo las células cromafines no cambian su fenotipo manteniéndose con sus características típicas (ver fig. 3, panel inferior).

En el caso de las células cromafines tratadas con el NGF podemos observar claramente como estas van cambiando su morfología conforme aumentan los días en cultivo, siendo cada día mas similares a las neuronas simpáticas, fenotípicamente hablando (fig. 4). Después del tercer o cuarto día en cultivo se observa como las células cromafines aumentan de tamaño y pierden su morfología circular adquiriendo una forma ovalada o poliédrica, esta es la principal característica del inicio de la transformación celular por efecto del NGF. Para el sexto o séptimo día las células hacen más evidente su forma oval y empiezan a emitir procesos citoplásmicos por las zonas apicales, y con ello se inicia la interconexión intercelular típica de las células nerviosas en cultivo. Otra observación importante en este punto del cultivo es que las células tienden a agruparse

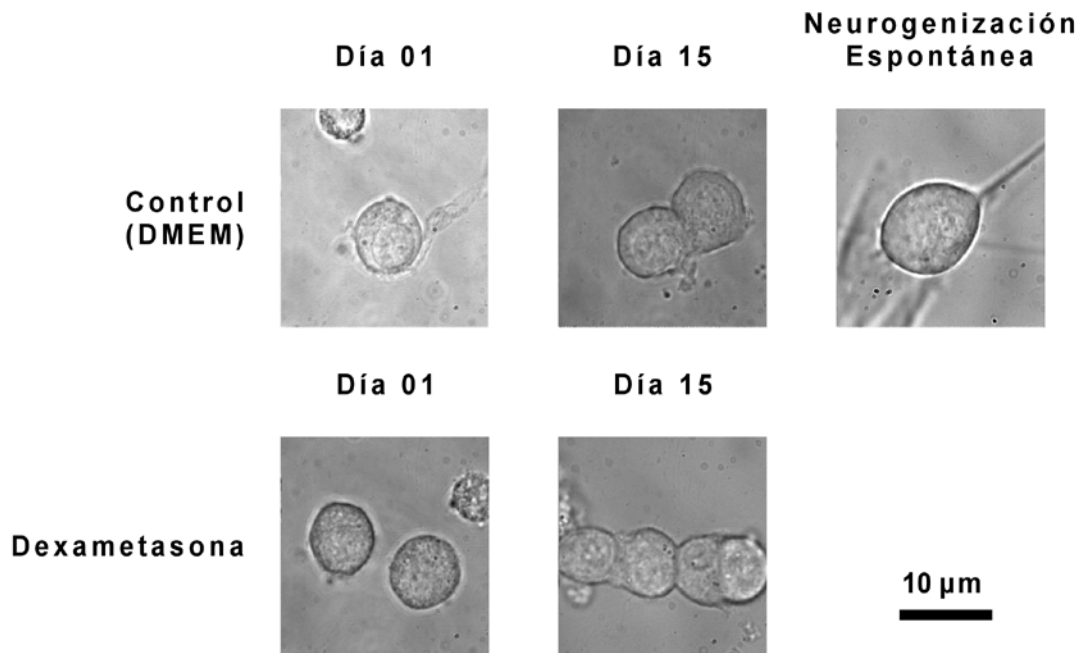
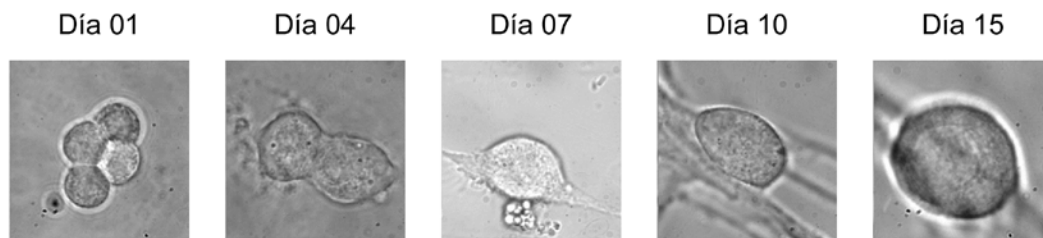


Figura 3. Imágenes en contraste de fases de células cromafines en cultivo. En el panel superior se observan las células en condiciones control (DMEM), al inicio del cultivo y 15 días después, en ambos casos no se aprecian cambios morfológicos importantes, solo algunas células presentan un proceso de neurogenización espontánea. En el panel inferior se muestran las células en presencia de dexametasona, las cuales no presentan cambios morfológicos ni neurogenización espontánea.

y a formar racimos, apiñándose unas sobre otras, lo cual hace difícil localizar células aisladas que permitan realizar buenos registros de las mismas. Posteriormente las células cromafines adoptan un fenotipo muy similar al neuronal, esto es a partir del día 11/12 en cultivo, la red intercelular se torna mas intrincada, al mismo tiempo el apiñamiento es más crítico. Ya para el día 15 ó 16 en cultivo en presencia del NGF las células son indistinguibles de las neuronas simpáticas en cultivo (fig 4), las células diferenciadas cuentan con un soma grande (40-50 μm de diámetro), el núcleo reduce su proporción con respecto del citoplasma siendo aproximadamente del 40 al 50%, y las células presentan una gran cantidad de procesos e interconexiones con células vecinas. Con fines exploratorios se dejaron cultivos de células en presencia del NGF durante 21 días, sin observarse ya cambios importantes en la neurogenización de las células cromafines pero sí encontramos que para estos días o en días posteriores de cultivo las células se empezaban a deteriorar, mostrando una membrana plasmática rugosa, una

gran cantidad de proyecciones, las cuales también muestran cierta rugosidad, y sobre todo que estas células se empezaban a despegar del plato de cultivo, indicando su poca viabilidad y haciendo sumamente difícil su estudio. Con base en lo expuesto anteriormente se determinó que el curso temporal de los cultivos sea de 15 días, tiempo en el que se observa un buen proceso de neurogenización de las células cromafines y además se cuenta con un buen material de trabajo, justo antes de que se empiece a deteriorar el cultivo y con ello se dificulte el estudio del mismo.

Células Cromafines



Neuronas Simpáticas

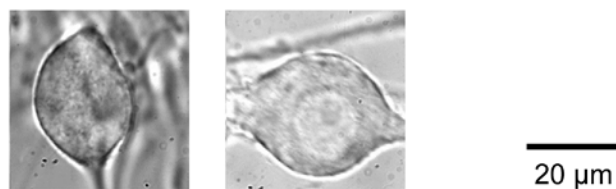


Figura 4. Imágenes en contraste de fases de células cromafines en cultivo en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF). En el panel superior se observa el proceso de neurogenización morfológica por efecto del NGF a los distintos tiempos en cultivo, desde el día 01 hasta el día 15, observándose como conforme aumenta el tiempo en presencia del NGF las células son cada vez más parecidas a las neuronas simpáticas (panel inferior) sobre todo si tomamos en cuenta el tamaño celular.

Como podemos observar las células neurogenizadas a los 15 días en cultivo son muy similares a las neuronas simpáticas, incluso podríamos decir que son prácticamente indistinguibles (fig. 4), en otros trabajos en donde se han estudiado las características a nivel subcelular se ha reportado que tampoco existen diferencias importantes a este nivel (Doupe, et. al., 1985). Con estas observaciones podemos concluir que el modelo empleado en este trabajo es adecuado para estudiar los cambios

en la homeostasis de calcio intracelular durante el proceso de neurogenización inducido por el NGF en las células cromafines en cultivo.

Sección II: Homeostasis de calcio intracelular en condiciones de reposo.

Uno de los aspectos importantes de la homeostasis intracelular del calcio es el estudio de la $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones basales, la cual es mantenida en niveles bajos por la interacción entre los sistemas de amortiguación del calcio, la secuestación y la extrusión (Pozzan, 1994). En muchas células la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo es mantenida estrictamente dentro de límites muy estrechos, pero en otras esta puede alcanzar grandes fluctuaciones, conocidas como actividad espontánea u oscilaciones espontáneas de la concentración de calcio.

En el caso particular de las células que se estudian en este trabajo se observó que el patrón del calcio basal es radicalmente distinto entre las neuronas simpáticas y las células cromafines. En las neuronas simpáticas la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene en niveles bajos, en un intervalo de 50 a 150 nM y sin presentar alguna actividad espontánea que induzca un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (fig. 5A), esto se debe a que en estas células los diversos mecanismos encargados de la homeostasis intracelular de calcio son altamente eficientes (Blaustein, 1988), por lo que en los registros realizados no se observan fluctuaciones o niveles altos de la basal de calcio.

En las células cromafines se observa que estas presentan niveles altos en la basal de calcio, los cuales pueden ser del orden de 200 a 400 nM o más, además de presentar una gran actividad espontánea de la $[Ca^{2+}]_i$, siendo esta en forma de oscilaciones con un patrón rítmico (fig. 5B) o aumentos breves en forma de transitorios o de meseta (fig. 5C). Los patrones de actividad espontánea mostrados en la figura 5B y 5C son de los tipos más frecuentes que se encuentran en las células cromafines durante los registros de calcio intracelular, siendo una característica propia de estas células (D'Andrea, 1995).

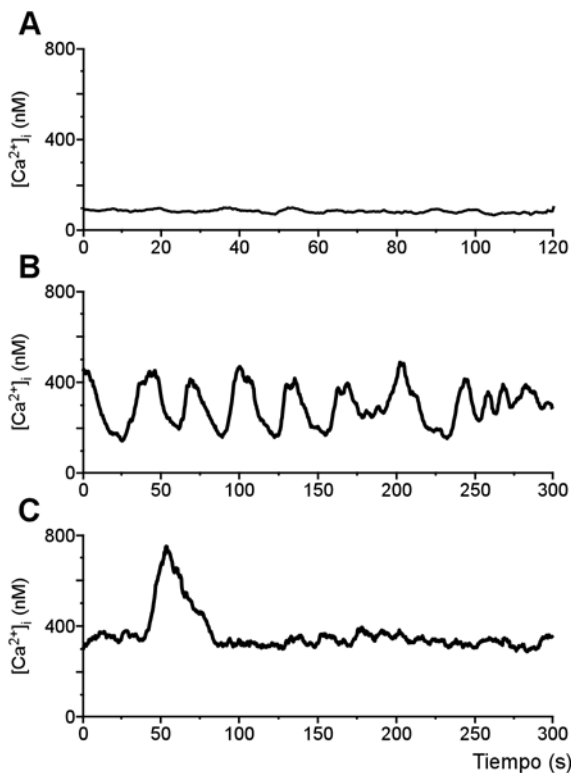


Figura 5. Registros de calcio basal en neuronas simpáticas y en células cromafines. A, Registro de una neurona simpática durante 2 min., en este registro no se visualiza actividad espontánea de calcio. B y C, Registros de células cromafines con 24 hrs. en cultivo. En B se observa un patrón oscilatorio del calcio intracelular, mientras que en C se observa un transitorio único durante el tiempo en registro.

En las células que presentan el patrón oscilatorio, la amplitud de las fluctuaciones de calcio es muy variable, en algunos casos sólo es del doble del valor de la basal (fig. 5B) (tomándose como el valor de la basal el valle de las ondas) y en otros puede alcanzar hasta tres o cuatro veces el valor de dicha basal, manteniéndose durante el tiempo en registro, pero también se encontraron células silentes en las cuales aparecían de pronto las oscilaciones y en el caso contrario células que tienen fluctuaciones de calcio y de pronto estas desaparecen y se vuelven silentes.

Los transitorios de calcio que se observan en las células cromafines (fig 5C) se caracterizan por ser incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ con una duración variable, los que se observan más comúnmente son aquellos que presentan un aumento de calcio con un máximo y posteriormente disminuye la concentración regresando a la basal, el curso temporal de estos transitorios se encuentra en promedio por debajo de los 50 seg de duración. En otros casos, los aumentos de calcio son de manera sostenida lo que se observa como un registro en forma de meseta, con un curso temporal variable pero que

en muchos casos comprende gran parte del tiempo de registro e incluso en algunas células ya no regresa al valor de la basal.

Con base en lo expuesto anteriormente se decidió evaluar la homeostasis intracelular del Ca^{2+} en condiciones de reposo tanto de las neuronas simpáticas como en las células cromafines con fines comparativos, y también para observar si las células cromafines modifican su dinámica de calcio en reposo durante el proceso de transformación por efecto del factor de crecimiento nervioso.

El calcio se cuantificó en las células cromafines a cuatro diferentes tiempos en cultivo durante un periodo de 15 días (01, 05, 10 y 15 días), en las tres condiciones experimentales descritas en materiales y métodos. Los niveles de Ca^{2+} en reposo también se midieron en neuronas simpáticas (NS) de 2-3 días en cultivo. Cabe mencionar que otros autores han reportado que las células cromafines expuestas al NGF experimentan cambios significativos, tanto morfológicos como funcionales, mientras que las células cromafines en presencia de dexametasona mantienen su fenotipo cromafin (Unsicker, 1978; Islas-Suarez, 1994; Morimoto, 1994), esto último nos es útil para establecer un patrón de comparación entre las células que conservan un fenotipo cromafin y las células tratadas con el NGF, el cual induce que las células adquieran un fenotipo similar al de las neuronas simpáticas (Aloe, 1979; Doupe, 1985). En el caso de las células del grupo control estas se utilizaron para observar el efecto que podría ejercer el medio de cultivo suplementado con el suero fetal bovino (SFB), ya que al desconocerse la composición exacta y cuantitativa del SFB este puede contener sustancias que afecten de manera significativa a las células cromafines.

Como se observa en la figura 6 los niveles basales de calcio medidos después de un día en cultivo son muy similares entre todos los grupos experimentales ($p > 0.66$), siendo apenas ligeramente mayor en el grupo DEX, además de que el valor de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se encuentra dentro de los valores reportados para estas células (entre 50 y 200 nM). Sin embargo, estos valores llegan a ser marcadamente diferentes después de 5 días en cultivo, tanto el grupo CON como el grupo DEX incrementan significativamente su $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo, de $62.9 \pm 7.5 \text{ nM}$ ($n=19$) a $454.3 \pm 32.6 \text{ nM}$ ($n=26$) y de $84.9 \pm 22.0 \text{ nM}$ ($n=6$) a $362.3 \pm 59.7 \text{ nM}$ ($n=17$), respectivamente ($p < 0.0001$, cuando se compara con células con un día en cultivo). Este aumento en los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de las células de

los grupos CON y DEX disminuye a los 10 días *in vitro*, aunque sigue presentando una diferencia significativa con respecto al primer día de cultivo en ambos casos ($p < 0.05$). A los 15 días se observa que disminuye aun más la $[Ca^{2+}]_i$ en estos grupos, y llega a ser similar a la registrada con un día en cultivo ($p > 0.36$). Los niveles de Ca^{2+} en reposo en las células cromafines después de 15 días en cultivo son muy similares entre las tres condiciones experimentales ($p > 0.7$), presentando una $[Ca^{2+}]_i$ alrededor de los 100 nM (ver tabla 1), incluso son similares a los registrados en las neuronas simpáticas ($p > 0.77$).

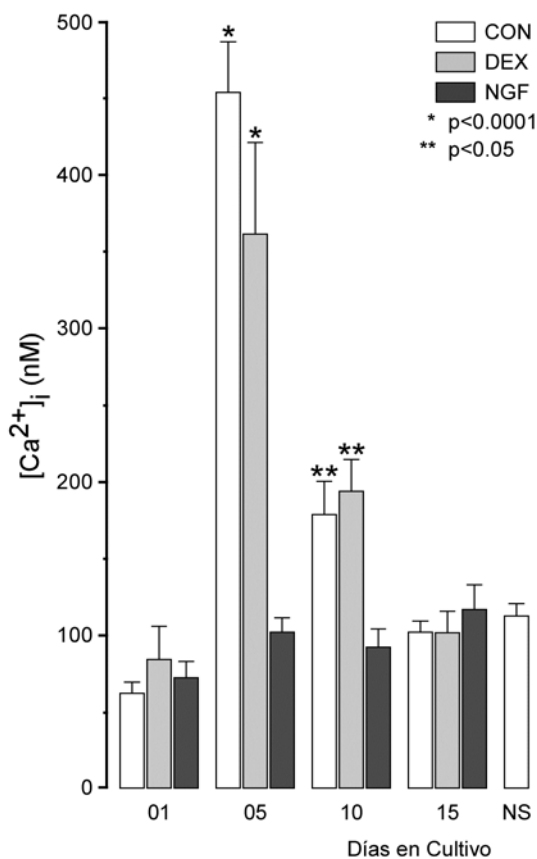


Figura 6. Media de la concentración basal de calcio intracelular. Cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ de las células cromafines en cultivo por efecto de los distintos tratamientos: Control (CON), Dexametasona (DEX) y Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), a diferentes tiempos. Se gráfica la media de las neuronas simpáticas (NS) con 2-3 días en cultivo con fines comparativos. Los asteriscos representan la diferencia significativa del grupo CON y DEX con respecto del grupo NGF al mismo tiempo de cultivo.

En el caso de las células expuestas al NGF estas no presentan cambios significativos en su $[Ca^{2+}]_i$ durante los 15 días que permanecen en cultivo, presentando un valor promedio de $[Ca^{2+}]_i$ entre 73 y 117 nM, sin encontrarse diferencias significativas entre los diferentes tiempos en cultivo ($p > 0.33$)(fig 6), además, también se puede observar que el valor de la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo de las células cromafines con 15 días de

exposición al NGF tienen un nivel de calcio intracelular muy similar al que presentan las neuronas simpáticas (117.34 ± 15.85 nM y 113.27 ± 7.97 nM, respectivamente, $p=0.92$). Esto deja claro que mientras en los grupos de las células CON y DEX se ve alterada la homeostasis de calcio intracelular durante el curso temporal del cultivo, en el grupo tratado con NGF no hay variaciones significativas.

El hecho de observar un aumento de la media de la $[Ca^{2+}]_i$ en los grupos CON y DEX no es suficiente para poder apreciar que es lo que está pasando con el calcio intracelular en las células cromafines bajo los distintos tratamientos, en otras palabras, no sabemos si este aumento de la media de la $[Ca^{2+}]_i$ se debe a un patrón oscilatorio (fig. 5B) o a un aumento transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ (fig 5C). Para evaluar este comportamiento utilizamos los mismos datos de donde se obtuvo la media aritmética, sólo que en este caso se emplearon para determinar la varianza sobre la media (VSM) de la línea basal de la $[Ca^{2+}]_i$.

El estudio de la varianza del calcio basal resulta de suma importancia ya que dependiendo del tipo de patrón que se presente en el registro de calcio se afectará el valor de la varianza, por ejemplo, en el caso de que se de un patrón oscilatorio de la concentración de calcio (fig 5B) se obtendrá un valor de la media alto y un valor de varianza alto debido a las continuas fluctuaciones del calcio intracelular, pero en el caso de que se obtenga un registro en forma de transitorio (fig 5C) se podría obtener un valor de la media bajo o elevado, pero el valor de la varianza sería bajo debido a que no se observarían variaciones continuas de la concentración de calcio.

Este simple análisis de los registros de las células (fig 7) revela diferencias importantes entre los distintos grupos: Primero, al día 1 en cultivo los valores de la VSM son relativamente bajos con respecto de los siguientes días del cultivo, lo que nos indica que al inicio del cultivo las células no presentan mucha actividad espontánea e incluso estos valores son muy parecidos entre los grupos CON, DEX y NGF ($p>0.64$) (tabla 1). Como punto de comparación cabe mencionar que los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ son menos variables en las neuronas simpáticas (fig 7), pero a pesar de este valor reducido no se observan diferencias significativas entre las tres condiciones experimentales de las células cromafines y las neuronas simpáticas ($p>0.22$). El que no haya una diferencia significativa entre los grupos con un día en cultivo y las neuronas se puede entender si

observamos el valor tan elevado que presenta el error estándar de las células cromafines (tabla 1), lo que nos habla de la alta variabilidad de la concentración del calcio basal con respecto de las neuronas.

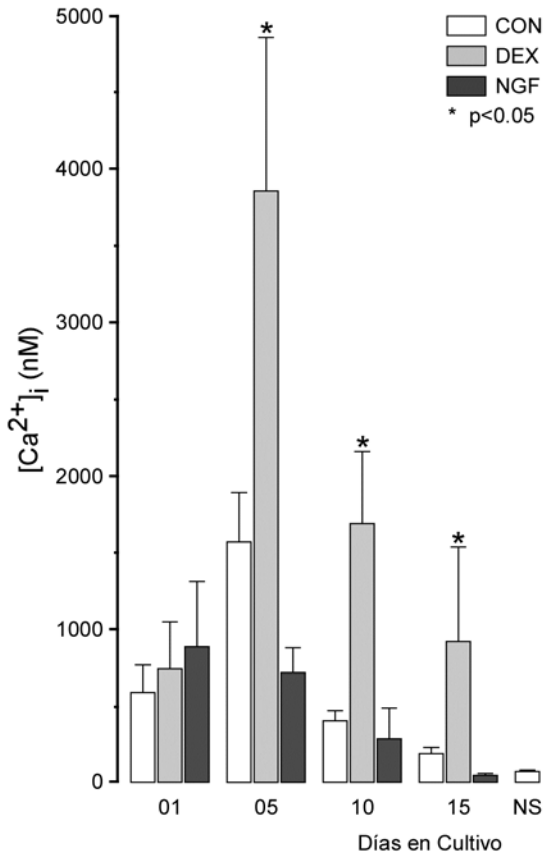


Figura 7. Varianza de la concentración de calcio intracelular. Se gráfica la media del análisis de la varianza de las células cromafines a los distintos tiempos en cultivo bajo los diversos tratamientos: CON, DEX y NGF. Se muestra la varianza de las neuronas simpáticas para fines de comparación. El asterisco representa la diferencia significativa del grupo DEX con respecto del grupo CON y NGF en los mismos días de cultivo.

Segundo, después de 5 días en cultivo, las fluctuaciones espontáneas (oscilaciones) de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células cromafines son mas frecuentes y con una mayor amplitud en el grupo CON y en especial en el grupo DEX. En consecuencia, la VSM incremento aproximadamente 150% y 420%, respectivamente, observándose una diferencia significativa sólo en el grupo DEX ($p=0.0001$), en el caso del grupo CON no podemos concluir que haya una diferencia significativa debido a que presenta un valor de “p” muy marginal ($p=0.056$), pero dicho valor si nos indica que hay una clara tendencia del grupo CON a tener un comportamiento similar al del grupo DEX (fig 7), pero sin alcanzar un incremento tan significativo en la actividad espontánea del calcio intracelular. En el caso de las células tratadas con el NGF se observa que desde el

quinto día de tratamiento ya presentan una ligera tendencia a disminuir el valor de la VSM, lo que nos indica que en este grupo el NGF esta induciendo una reducción de la actividad espontánea del calcio intracelular, manteniendo la $[Ca^{2+}]_i$ más estable que en el caso de los grupos CON y DEX.

Tercero, la VSM de todos los grupos disminuye progresivamente a los 10 días en cultivo (fig 7) a niveles parecidos e incluso por debajo a los valores de los registros hechos en el primer día en cultivo, sobre todo en los grupos CON y NGF, los cuales continúan con una tendencia a disminuir aun más y de manera progresiva la VSM, lo que se observa mas claramente en el día 15 de cultivo, y aunque en el grupo DEX también hay una clara disminución, los valores tan elevados de la desviación estándar no permiten considerar a estas disminuciones como similares a las que se observan en los grupos CON y NGF. Estas diferencias tan marcadas vistas entre el grupo DEX y los grupos CON/NGF después de 10 días en cultivo, no llegan a ser estadísticamente significativas a los 15 días ($p > 0.18$).

Para el día quince del cultivo en las células tratadas con el NGF la VSM es prácticamente idéntica a la de las neuronas simpáticas ($p = 0.97$), y en el caso del grupo CON se observa también una clara tendencia a adoptar los valores de las neuronas simpáticas ($p = 0.82$) y aunque en el caso de las células tratadas con dexametasona hay una disminución, estas aun se mantienen alejadas del comportamiento de las neuronas ($p = 0.14$), pero sin presentar diferencias significativas.

Para examinar estas diferencias más de cerca, los valores de la VSM de los diferentes grupos se graficaron como histogramas de frecuencia. En la figura 8 se puede observar la distribución del grupo control, siendo evidente que para el quinto día en cultivo hay una mayor dispersión de la varianza, lo cual corresponde a lo observado en la figura 7, disminuyendo progresivamente en los siguientes días en cultivo y presentando la misma tendencia que el grupo NGF a los 15 días, sin encontrarse diferencias significativas con dicho grupo o con las neuronas simpáticas ($p = 0.81$ y $p = 0.82$, respectivamente). Sin embargo, el grupo tratado con dexametasona (fig. 8) presenta una distribución mucho más extendida al día cinco (ver escala de las abscisas) recuperándose moderadamente para el día 10 y 15, pero sin alcanzar los niveles presentados por el grupo CON o el grupo tratado con el NGF. Es importante señalar

que en este grupo los niveles de calcio intracelular son muy variables debido a que presentan una actividad espontánea muy elevada, sobre todo en forma de oscilaciones (fig 5b), lo cual es común en las células cromafines (D'Andrea, 1995; 1996; Malgaroli, 1991). En el grupo expuesto al NGF observamos que durante el curso temporal del cultivo la variabilidad de la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye de manera progresiva, lo cual se ve claramente en la figura 8, además al ser comparada con las neuronas simpáticas encontramos que tienen un patrón muy similar, de hecho encontramos que el valor promedio de la varianza de la $[Ca^{2+}]_i$ es menor en las células cromafines neurogenizadas que en las neuronas (ver tabla 1).

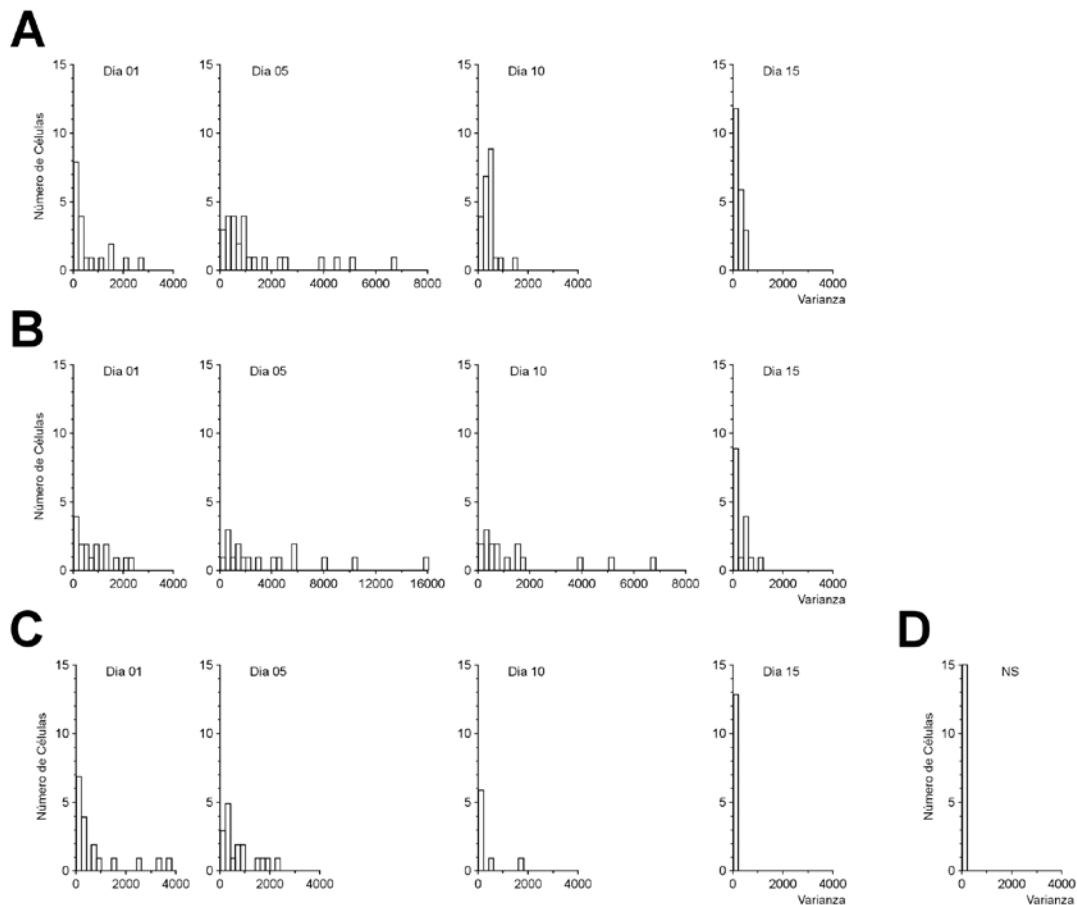


Figura 8. Histogramas de frecuencia de la varianza de la $[Ca^{2+}]_i$ en células cromafines en las distintas condiciones de cultivo y a los diferentes tiempos. A, células en condiciones control (CON). B, células tratadas con dexametasona (DEX). C, células en cultivo en presencia del factor de crecimiento nervioso (NGF). D, neuronas simpáticas (NS) con 2-3 días de cultivo.

Es importante hacer notar que después de 15 días de tratamiento con el NGF, tanto los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo y la VSM de las células cromafines llega a ser prácticamente indistinguible del de las neuronas simpáticas. Estos cambios, los cuales corresponden a las alteraciones morfológicas y propiedades excitables que ya se han reportado, representan el primer indicio de que la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ se reorganiza, reflejando un patrón que gradualmente es más similar al de las neuronas simpáticas en reposo.

TABLA 1				
	Días en Cultivo	n	Basal	Varianza de la Basal
CON	01	19	62.9 ± 7.4	619.4 ± 181.3
	05	26	454.3 ± 32.6	1638.7 ± 334.9
	10	23	179.4 ± 21.6	429.9 ± 67.0
	15	09	102.7 ± 7.3	206.4 ± 36.9
DEX	01	06	84.9 ± 22.0	775.1 ± 318.1
	05	17	362.3 ± 59.0	4016.1 ± 1041.2
	10	16	194.3 ± 20.8	1761.2 ± 489.8
	15	17	102.1 ± 13.7	958.0 ± 645.0
NGF	01	10	73.1 ± 10.5	928.0 ± 443.0
	05	17	102.4 ± 9.7	752.1 ± 168.8
	10	08	92.9 ± 12.1	303.8 ± 211.7
	15	13	117.3 ± 15.8	57.8 ± 5.3
NS	<3	16	113.2 ± 7.9	81.7 ± 11.2

Sección III: Alteraciones en la magnitud y cinética de los transitorios de calcio de canales operados por voltaje en células cromafines.

Las células cromafines expresan varios subtipos de canales de calcio voltaje dependientes (CCVD), encontrándose de manera predominante los subtipos L, N y P/Q, y cuyo principal aporte fisiológico es el permitir el influjo de calcio y con ello el aumento del calcio intracelular, lo cual facilita la secreción de las vesículas ya sean adrenérgicas y/o noradrenérgicas (Lomax, 1997). En el caso particular de las células cromafines de rata se ha encontrado que el mayor aporte del influjo de calcio se lleva a cabo a través de canales de calcio tipo L ($\approx 50\%$) y tipo N ($\approx 30\%$), y en menor cantidad por los canales tipo P/Q ($\approx 15\%$), lo cual es incluso similar a otras especies animales como son los gatos ya que presentan porcentajes muy parecidos. Esta observación es muy importante si tenemos presente que dentro de las diferentes subpoblaciones de CCVD es el subtipo L el que está directamente relacionado con la secreción de las vesículas en las células cromafines (Gandía, 1995; Lomax, 1997).

En el caso de las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior las subpoblaciones de CCVD presentes también son de los subtipos L, N y P/Q, pero en diferentes porcentajes, si se compara con las células cromafines. En las neuronas simpáticas se encuentra de forma predominante el canal de calcio subtipo N ($\approx 80\%$) y en una mucho menor proporción el subtipo L y el P/Q ($\approx 20\%$ entre ambas) (Regan, et al., 1991). Estas diferencias en el porcentaje de las subpoblaciones de canales de calcio presentes en las células cromafines y en las neuronas simpáticas nos indican que ante una despolarización el aumento del calcio intracelular podría presentar patrones distintos, además de que ya ha sido reportado que la densidad y el patrón de expresión de canales de calcio voltaje dependientes en células cromafines incrementa posteriormente al tratamiento de estas células con el NGF (Morgado-Valle, 1998), pero incluyendo el trabajo que se acaba de mencionar se conoce muy poco acerca de las implicaciones de estas alteraciones sobre la señalización del calcio intracelular.

Por lo expuesto anteriormente se decidió explorar el comportamiento de la dinámica de calcio intracelular ante una despolarización con alto potasio (140 mM, por 400 msec) en las células cromafines a los diferentes tiempos en cultivo, y bajo los

distintos tratamientos, así como en las neuronas simpáticas para observar las diferencias en los transitorios de calcio ante dicha despolarización.

Como podemos observar en la figura 9a y 9b los patrones de los transitorios de calcio en las células cromafines son marcadamente distintos a los de las neuronas simpáticas, tanto en la amplitud como en la cinética. Para cuantificar y poder comparar de manera adecuada estos transitorios se realizaron los siguientes análisis:

a) Amplitud del transitorio ($\Delta[Ca^{2+}]_i$), se obtiene a partir del punto máximo del transitorio y se le resta el valor promedio de la basal (fig 9c), este dato nos indica la concentración máxima de calcio que se presentó en el interior de la célula, producto de la despolarización de la membrana plasmática.

b) Derivada del transitorio ($d[Ca^{2+}]_i/dt$), se calcula la derivada de todo el transitorio y se toma el punto máximo de la derivada de la primera espiga (fig 9d), este dato nos revela la velocidad máxima de entrada de calcio a la célula.

c) Área bajo la curva ($\Delta[Ca^{2+}]_i * t$), se calcula a partir de la integral del transitorio de calcio, lo que nos indicará la cantidad total de calcio que se movilizó durante el transitorio.

d) Velocidad de decaimiento de la concentración de calcio (fig 9c, línea continua), nos indica el tiempo en que la $[Ca^{2+}]_i$ decae en un 63%.

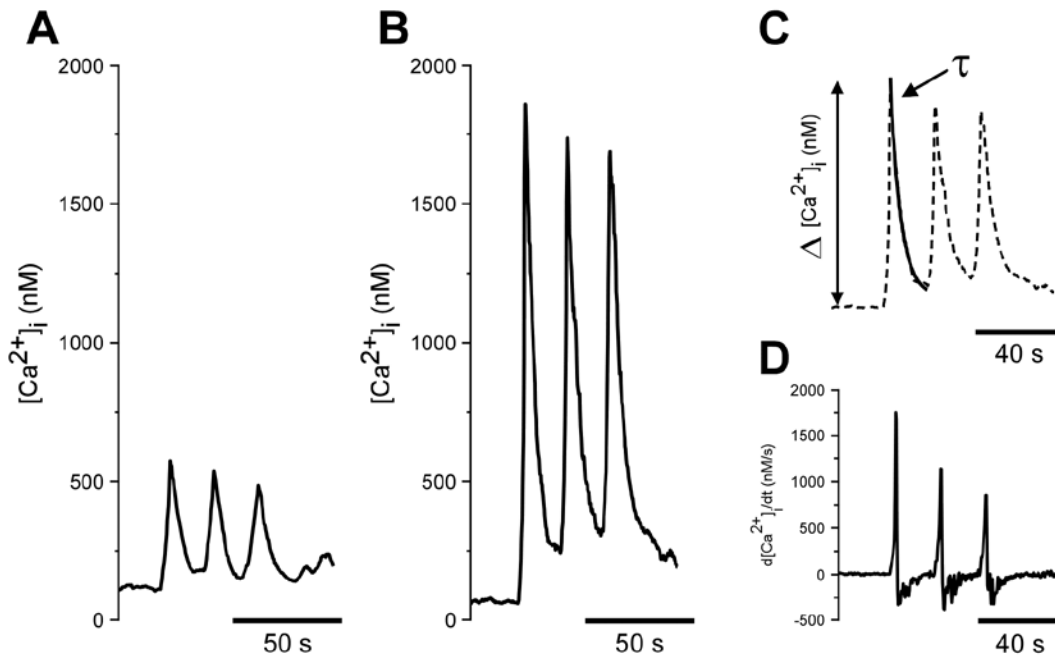


Figura 9. Transitorios de calcio inducidos por potasio alto (KCl 140 mM), y análisis de los mismos. A y B, transitorios de calcio de una célula cromafín y de una neurona simpática respectivamente, cada espiga corresponde a una aplicación de potasio de 400 ms. C, Análisis de la amplitud del primer transitorio de calcio. ($\Delta [Ca^{2+}]_i$) = Valor máximo del transitorio menos el valor promedio de la concentración basal de calcio. En el primer transitorio también se calculó el valor de la constante de decaimiento (τ) con el ajuste de una exponencial. D, Análisis de la derivada de los transitorios de calcio ($d[Ca^{2+}]_i/dt$), para este análisis solo se tomó el valor de la primera espiga.

Con base en lo explicado en el párrafo anterior se procedió a realizar el análisis de los transitorios de calcio por efecto de la despolarización con alto potasio en las células cromafines en cada una de las condiciones experimentales, así como en las neuronas simpáticas. Cabe mencionar que aunque se dieron tres pulsos de potasio con una duración de 400 msec c/u sólo se mostrarán los resultados del análisis del primer transitorio, esto debido a que al hacer un análisis discreto del segundo y tercer transitorio se observa un comportamiento muy similar al primero, con la única diferencia que estos transitorios presentan una ligera disminución en todos los parámetros cuantificados, lo que nos indica que podrían estar afectados por un proceso de desensibilización, por lo que todos los resultados que se muestran a continuación son analizando únicamente el primer transitorio.

La figura 10A resume los resultados obtenidos de medir la amplitud del pico de los transitorios de calcio, inducidos por una estimulación con alto potasio, en las células cromafines y en las neuronas simpáticas. Después de un día en cultivo podemos observar como las tres condiciones experimentales de las células cromafines no presentan diferencias significativas entre ellas ($p > 0.53$), teniendo como característica común que la amplitud máxima en cualquiera de las tres condiciones es apenas 1/3 de la amplitud de las neuronas simpáticas o de las cromafines neurogenizadas (ver tabla 2).

En el caso de las células con 5 días en cultivo cabe hacer una aclaración, como se puede observar en la fig 10A la barra correspondiente al grupo control se encuentra ausente, esto se debe a que durante los registros de las células de este grupo ($n=26$) se encontró que estas no respondían a la estimulación con alto potasio, sólo algunas células ($n=4$) de toda la población respondieron con aumentos muy discretos de calcio, que incluso se podrían interpretar como fluctuaciones de la basal y en otros casos los transitorios de los tres pulsos se sobrelapaban dando la apariencia de un sólo transitorio en forma de meseta difícil de cuantificar de acuerdo a los parámetros establecidos para el análisis de los transitorios. En los grupos DEX y NGF se observa que estos presentan un aumento de casi el 100% en la amplitud de los transitorios pero sin alcanzar una diferencia significativa con sus respectivos grupos con un día en cultivo ($p > 0.16$).

A los días 10 y 15 se observa que tanto el grupo CON como el grupo DEX muestran una disminución en la media de la amplitud, mostrando valores muy similares a un día en cultivo. Podemos observar que en el grupo control el único cambio que se observó fue una disminución continua conforme aumentaban los días en cultivo. En el caso del grupo DEX este presentó un aumento transitorio en los días 5 y 10 de cultivo, el cual fue casi el doble, pero sin presentarse diferencias significativas y regresando a un valor muy similar al del primer día en cultivo después de 15 días. Cabe señalar que en el caso del grupo DEX a los días 5 y 10 el valor del error estándar es elevado (± 255 y ± 265 , respectivamente), esto se debe principalmente a que en ambos tiempos algunas células presentaron transitorios con muy baja amplitud (en un intervalo de 200 a 400 nM) muy parecidos a algunos transitorios encontrados en el grupo control a los 5 días, lo que nos indica que esta característica de ausencia de respuesta después de

una despolarización no es exclusiva del grupo CON a los 5 días sino que también se encuentra en las células tratadas con dexametasona.

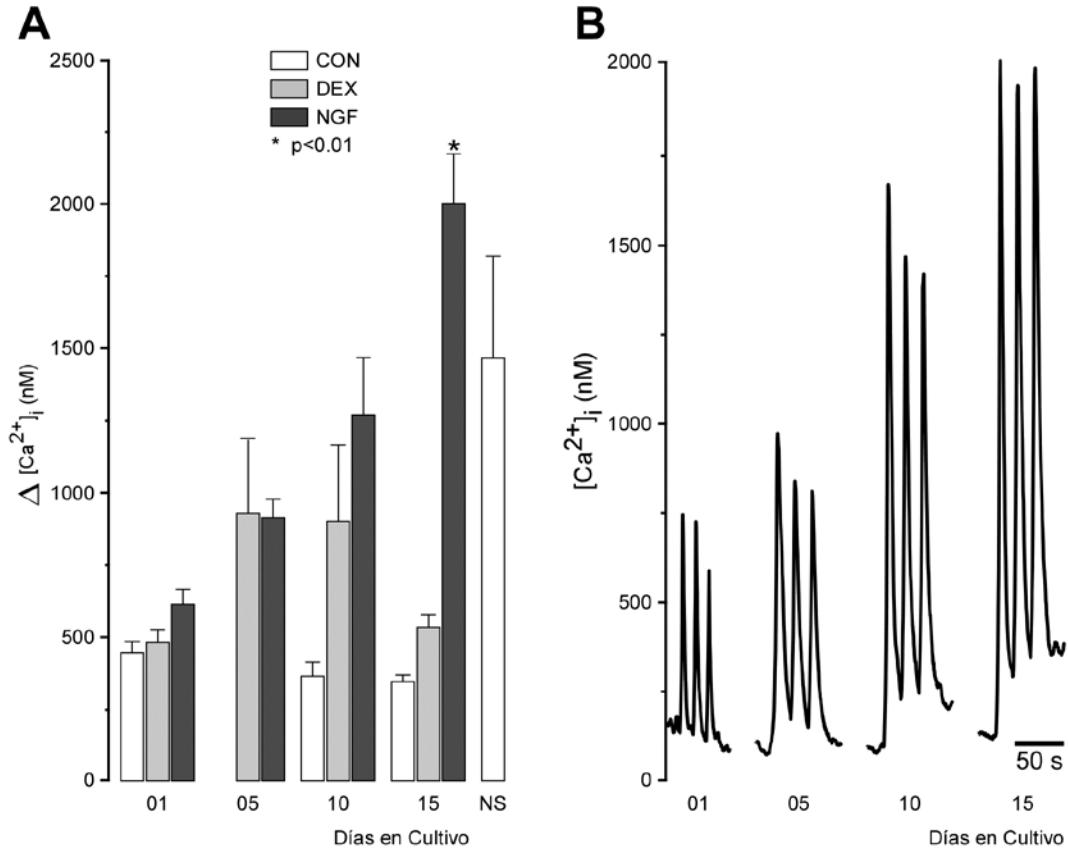


Figura 10. Análisis de la amplitud de los transitorios de calcio inducidos por la depolarización con potasio alto. A, Gráfica de los valores promedio de la amplitud y los errores estándar para cada una de las condiciones de cultivo a los diversos tiempos. B, Trazos representativos de los transitorios de calcio en células cromafines tratadas con el NGF, donde podemos observar el aumento gradual y progresivo de la amplitud.

En el caso del grupo tratado con el NGF se observa un claro incremento en la amplitud de los transitorios, el cual es gradual y progresivo desde el primer día en cultivo hasta el día 15 (fig. 10B). En los cultivos de células cromafines con un día en presencia del NGF la amplitud y la cinética de los transitorios es muy similar a la del grupo control al mismo tiempo (fig. 9A), pero a partir del día cinco se empiezan a modificar ambos parámetros asumiendo un patrón cada vez mas parecido al de una

neurona simpática (fig. 9B), incluso se observa una correlación casi lineal en los tres primeros tiempos e incrementándose de manera importante el último día alcanzando un 226% de aumento con respecto al primer día (fig. 10A)(ver tabla 2), analizando estadísticamente la amplitud del día 15 esta presenta diferencias significativas, tanto al interior del grupo del NGF como cuando se compara con los otros grupos a los distintos tiempos en cultivo ($p < 0.01$), incluso mantiene una diferencia significativa marginal con la amplitud de las neuronas simpáticas ($p = 0.04$).

En el estudio de los transitorios de calcio inducidos por una despolarización, el segundo paso fue examinar el valor máximo de la $d[Ca^{2+}]_i/dt$, esto se llevó a cabo analizando la primera derivada de los registros de calcio y midiendo el valor al pico durante el incremento del transitorio de Ca^{2+} . Este valor va a estar más estrechamente relacionado con la velocidad del influjo citoplásmico de calcio que con la amplitud del transitorio de calcio (Song, et. al., 1998).

En la figura 11A se puede observar los efectos de los distintos tratamientos sobre la velocidad de movilización del calcio a través de los canales de calcio voltaje dependientes, siendo muy evidente la diferencia entre las células con el NGF y los grupos CON y DEX. Analizando más detalladamente el gráfico podemos ver que la tendencia en todos los grupos a los distintos tiempos fue muy similar a lo observado en la gráfica de la amplitud del transitorio (fig 10A) y también en el análisis del área del transitorio (fig 11B), pero al cuantificar los porcentajes de aumento en el grupo tratado con el NGF al día uno y al día 15, así como entre el grupo con NGF y los otros grupos al día 15 encontramos diferencias importantes en los distintos análisis. Por ejemplo, en el caso de la derivada del primer transitorio el grupo NGF a los 15 días aumento un 430% con respecto del NGF a un día y un 845% con respecto a los otros grupos a los 15 días de cultivo, y en el caso del área, al igual que la derivada, aumento un 200% y un 166% respectivamente. Tomando estos datos, junto con los porcentajes de la amplitud (227% y 275%, respectivamente) se puede ver claramente que los aumentos en la amplitud y el área bajo la curva representan poco más del doble, sin embargo, en el caso de la derivada el aumento es mucho mayor, lo que nos indica que durante el proceso de neurogenización de las células cromafines estas presentaron cambios importantes en la dinámica de calcio ante una despolarización, pero ante todo se vio un cambio drástico en la velocidad del influjo de calcio, lo que está directamente relacionado con la

expresión de los canales de calcio voltaje dependientes de la membrana plasmática en dichas células.

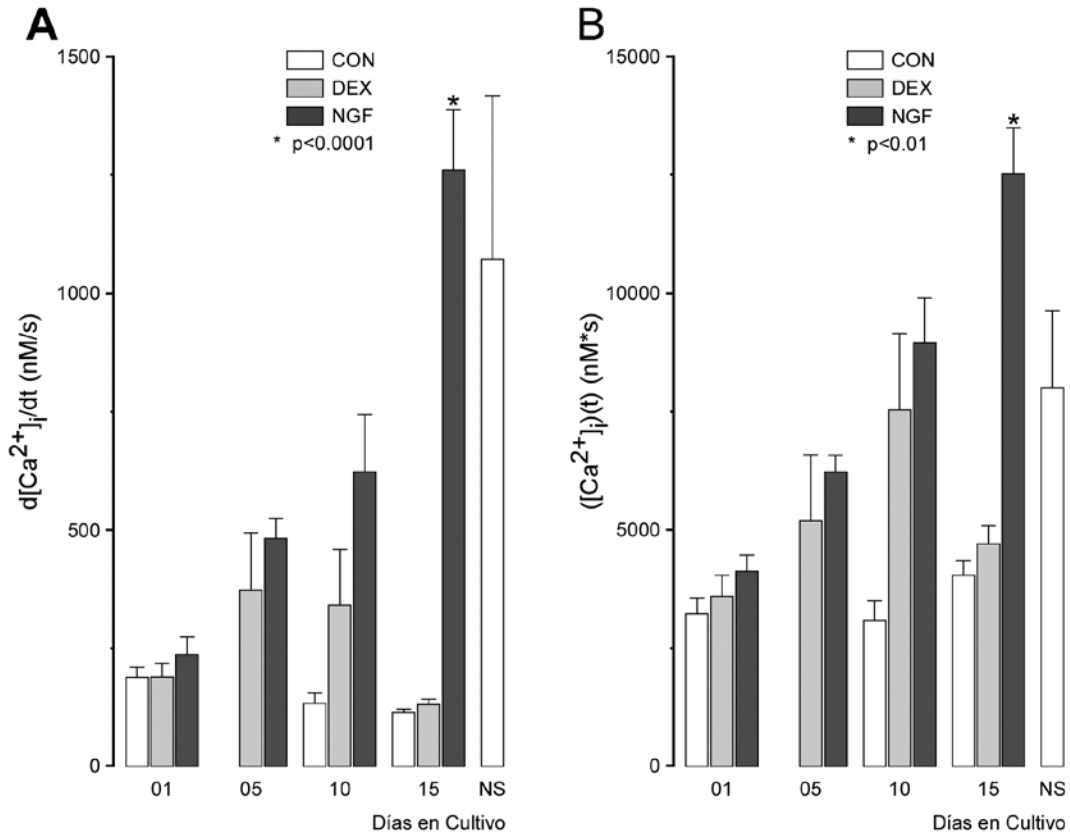


Figura 11. Derivada y Área bajo la curva del primer transitorio de calcio. A, Derivada del aumento de calcio después de la aplicación de un pulso de potasio alto. B, Área bajo la curva del primer transitorio de calcio. Ambos análisis se realizaron en las células cromafines bajo los distintos tratamientos y a los diferentes tiempos de cultivo.

Al igual que el influjo de calcio en las células cromafines y en las neuronas simpáticas la remoción de este ión del citoplasma es de suma importancia dentro de los procesos fisiológicos que lo involucran, esto con el fin de evitar que dichos aumentos de calcio se mantengan por periodos de tiempo prolongados y se altere de manera significativa el funcionamiento de la célula. Para evitar que esto suceda las células cromafines, al igual que otros tipos celulares, cuentan con mecanismos especializados en la remoción de calcio del citosol, encontrándose entre los principales: la extrusión del

calcio al espacio extracelular a través de ATPasas $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la incorporación de calcio al retículo endoplásmico por ATPasas de Ca^{2+} , el secuestro por proteínas quelantes de calcio y la captura de este ion por parte de otros organelos, como es el caso de las mitocondrias. En el caso de las células cromafines este último mecanismo es el más importante dentro de los procesos de remoción del calcio intracelular, pasando el papel de las ATPasas a un segundo plano (Park, et. al., 1996). Al igual que en el caso de la dinámica de calcio ante una despolarización las características de los mecanismos de remoción del calcio intracelular en las células cromafines tratadas con el NGF han permanecido sin ser exploradas. Bajo esta premisa se decidió analizar cual es el comportamiento de los mecanismos de remoción de calcio en las células cromafines bajo los distintos tratamientos y a los distintos tiempos, tomando como punto de comparación la velocidad de remoción del calcio en las neuronas simpáticas. Para llevar a cabo este análisis se tomo en cuenta que después de una breve despolarización de la membrana el rápido componente inicial del decaimiento se puede ajustar adecuadamente con una función exponencial con una sola constante de tiempo (τ), y es a partir de este valor que se cuantifica la velocidad de remoción del calcio en estas células.

En la figura 12A se muestran los resultados del análisis de la constante de decaimiento. Como se puede observar en el grupo CON la τ aumento conforme se incrementó el número de días en cultivo, esto significa que mientras mas tiempo estuvieron las células en cultivo mas lenta se hacia la remoción de calcio del citosol, tardando casi el doble de tiempo si se compara el día quince con el primer día en cultivo (ver tabla 2), esta observación es más evidente si se compara con el grupo NGF con 15 días y las neuronas simpáticas (fig 12B), incluso al interior de este grupo (CON) se encontraron diferencias significativas entre los distintos días en que se evaluó esta constante ($p < 0.03$).

En el caso del grupo DEX el valor de la τ se mantuvo constante en todos los días en que se registro, con excepción del día 10, en donde se observó un aumento de $\approx 60\%$ con respecto del resto de los valores, pero dicho retardo sólo fue transitorio ya que para el día 15 retorno a un valor similar a los días 01 y 05.

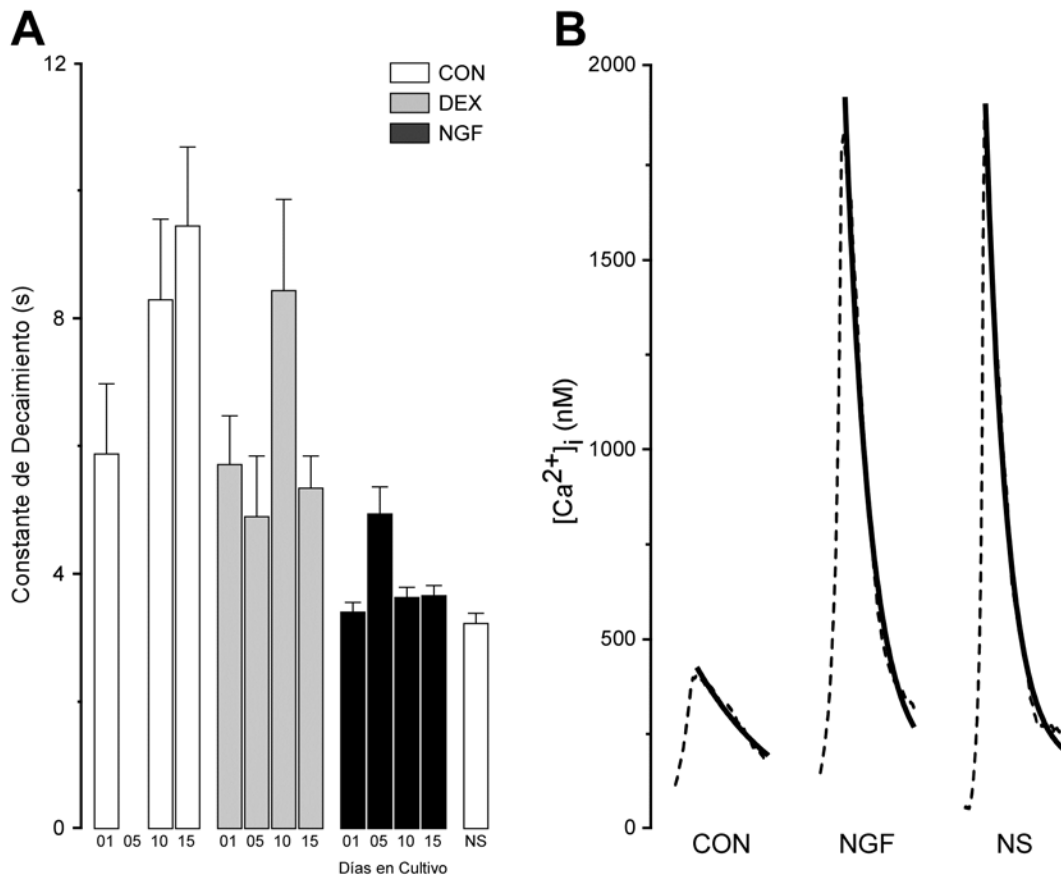


Figura 12. Constante de decaimiento (Tau) de los transitorios de calcio inducidos por depolarización. A. Representación gráfica de la media \pm el error estándar de las células cromafines en cultivo en los distintos tratamientos. **B.** Trazos representativos de la constante de decaimiento en células cromafines del grupo control (CON), con el factor de crecimiento nervioso (NGF), así como de neuronas simpáticas (NS).

En el grupo tratado con el NGF se observó que desde el principio este mantuvo valores rápidos de remoción del calcio, incluso muy similares a los tiempos observados en las neuronas simpáticas. Si analizamos las tres condiciones de cultivo al primer día encontramos que entre estas no se presentan diferencias significativas ($p > 0.09$), a pesar del valor reducido del grupo NGF (3.4 seg.), pero sí se pone de manifiesto que hay una tendencia de este grupo a mantener valores bajos de la (τ), no obstante que se haya dado un aumento transitorio para el quinto día de cultivo, pero sin presentar diferencias significativas con el resto de los días registrados ($p > 0.3$). Si examinamos al interior del grupo NGF, con excepción del día 5, los valores de la (τ) son muy similares

entre los distintos días de registro ($p>0.87$), lo que indica que los mecanismos de remoción de calcio se optimizaron desde el principio, y se mantuvieron a lo largo del cultivo, y si incluimos a las neuronas simpáticas en este análisis encontramos que se mantiene la homogeneidad de los valores de la (τ) ($p>0.75$), siendo muy similares entre las células tratadas con NGF y las neuronas, lo cual es mas evidente si se comparan los ejemplos presentados en la fig 12B.

Después de analizar los transitorios de calcio inducidos por una despolarización, podemos ver claramente que las células cromafines neurogenizadas, por efecto del NGF, adoptan patrones de respuesta muy parecidos o casi similares a los presentados por las neuronas simpáticas, no siendo así el caso de las cromafines control o tratadas con dexametazona, las cuales sólo presentan cambios transitorios, pero que en general regresan a los valores mostrados al inicio del cultivo.

TABLA 2						
	Días en Cultivo	n	Amplitud	Derivada	Área	Tau
CON	01	19	446.4 ± 39.3	196.6 ± 21.2	3244 ± 332	5.87 ± 1.09
	05	26	±	±	±	±
	10	23	364.6 ± 47.9	139.9 ± 22.5	3090 ± 406	8.29 ± 1.26
	15	09	346.0 ± 22.0	119.6 ± 7.5	4010 ± 303	9.44 ± 1.24
DEX	01	06	480.8 ± 44.3	198.3 ± 28.9	3603 ± 446	5.71 ± 0.75
	05	17	928.6 ± 255.4	388.1 ± 124.5	5188 ± 1387	4.89 ± 0.94
	10	16	898.6 ± 265.2	354.7 ± 120.3	7534 ± 1601	8.44 ± 1.42
	15	17	534.9 ± 42.3	138.0 ± 10.8	4704 ± 392	5.33 ± 0.49
NGF	01	10	611.9 ± 52.1	247.0 ± 38.3	4123 ± 332	3.4 ± 0.14
	05	17	913.6 ± 62.1	500.7 ± 44.0	6227 ± 351	4.94 ± 0.42
	10	08	1269.2 ± 198.9	646.5 ± 125.3	8953 ± 940	3.63 ± 0.16
	15	13	2000.4 ± 171.4	1306.5 ± 132.0	12513 ± 972	3.66 ± 0.15
NS	<3	16	1464.4 ± 350.3	1110.9 ± 357.6	7994 ± 1629	3.22 ± 0.15

Sección IV: Alteraciones en la magnitud y en la cinética de la movilización de calcio inducida por cafeína en las células cromafines.

Las células cromafines y las neuronas simpáticas, al igual que la mayoría de las células eucariontes, poseen organelos que llevan a cabo la función de servir como reservorios de calcio, teniendo como característica especial el permitir un rápido intercambio de calcio. Estos reservorios, que corresponden a regiones especializadas del retículo endoplásmico liso, son las fuentes de calcio que ante un estímulo son capaces de liberar el calcio que tienen almacenado y con ello inducir un incremento del calcio intracelular, o en el caso de que se presente otra fuente de calcio, por ejemplo del entorno extracelular, contribuir al aumento de calcio en el citoplasma (Sui, 1994; Kostyuk, 1994). Otra función, no menos importante, es servir como sumideros de calcio, que participan de manera activa en la terminación de las señales de calcio, esto a través de incorporar el calcio citosólico al interior de dichos reservorios utilizando ATPasas encargadas de transportar a este ión al interior, rellenando las pozas y dejándolas listas para una posterior liberación de calcio (Park, 1996). Los reservorios de calcio pueden ser divididos en dos clases: los que se activan por el segundo mensajero inositol 1,4,5-trisfosfato (InsP_3), y los activados por el ADP ribosa cíclico (cADPR, Fuirichi, 1994). Los reservorios que contienen el receptor sensible a InsP_3 van a liberar el calcio que contienen en respuesta a este segundo mensajero, en el caso de las células cromafines la generación del InsP_3 proviene de la activación del receptor muscarínico de acetilcolina, principalmente, contando también con otros receptores que pueden generar a este segundo mensajero (Ohta, 1996). En el caso de los reservorios que liberan en respuesta al cADPR se sabe que poseen canales de liberación de calcio a los que se une el alcaloide rianodina con muy alta afinidad y son específicamente activados por el alcaloide cafeína. Por lo tanto, la movilización de calcio inducida por cafeína se asume es el resultado de la liberación de calcio de reservorios intracelulares a través de los receptores a rianodina que actúan como canales de liberación de calcio (Kuba, 1994; Usachev, 1993). En neuronas simpáticas, así como en células cromafines, esta vía de liberación de calcio ha sido ampliamente estudiada (Liu, 1991; Thayer, 1988), quedando de manifiesto importantes diferencias en la cinética y magnitud de la liberación de calcio en estas poblaciones de células (Cheek, 1993, Hernández-Cruz, 1997).

En el estudio de la caracterización de la respuesta de las neuronas simpáticas ante un estímulo de cafeína encontramos que el tipo de respuesta es de tipo bifásico, siempre que se encuentren llenos los reservorios de calcio, la primera fase es en forma de espiga y consta de un aumento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ alcanzando un pico y posteriormente la $[Ca^{2+}]_i$ decae exponencialmente para dar una segunda respuesta en forma de meseta que se mantiene mientras dura el estímulo de cafeína, una vez que se retira el estímulo el valor de la $[Ca^{2+}]_i$ regresa a su basal (fig 13B)(Hernández-Cruz, 1997).

En las células cromafines la respuesta a cafeína es distinta (fig 13A). Ante un pulso de cafeína 10 mM, y con una duración de 30 seg., encontramos que sólo se observa un aumento discreto de calcio de aproximadamente un tercio, o menos, del observado en las neuronas. La respuesta a cafeína no es inmediata, sino que se observa un retraso de varios segundos y después inicia el incremento de calcio. Sólo se presenta un componente en forma de transitorio, con un aumento lento de la $[Ca^{2+}]_i$ y disminuyendo también de forma lenta. Por último, aun en la presencia de cafeína la concentración de calcio empieza a disminuir, regresando a su nivel basal o manteniéndose ligeramente por encima de este. Con base en estas diferencias se decidió explorar de manera mas detallada la respuesta a cafeína en las células cromafines en cultivo durante el proceso de neurogenización para ver si esta respuesta permanecía igual que en las células nativas o se asemejaba con el tiempo a la respuesta de una neurona simpática.

Para llevar a cabo este estudio se dio a las células cinco pulsos de cafeína 10 mM con una duración de 30 seg., se utilizó este protocolo en base a trabajos previos (Hernández-Cruz, 1997) y con el fin de poder tener un patrón de comparación adecuado. De los resultados obtenidos sólo se discutirán los resultados obtenidos de la respuesta de las células cromafines, en el caso de las neuronas simpáticas sólo se mencionarán algunas características de dicha respuesta, pero se tomarán principalmente como una respuesta de referencia o comparativa para las células cromafines. De los cinco pulsos dados a las células sólo se analizará la respuesta del primer pulso, esto obedece a que la respuesta a pulsos subsecuentes de cafeína se ve afectada de manera importante por el nivel de calcio almacenado en los reservorios, el

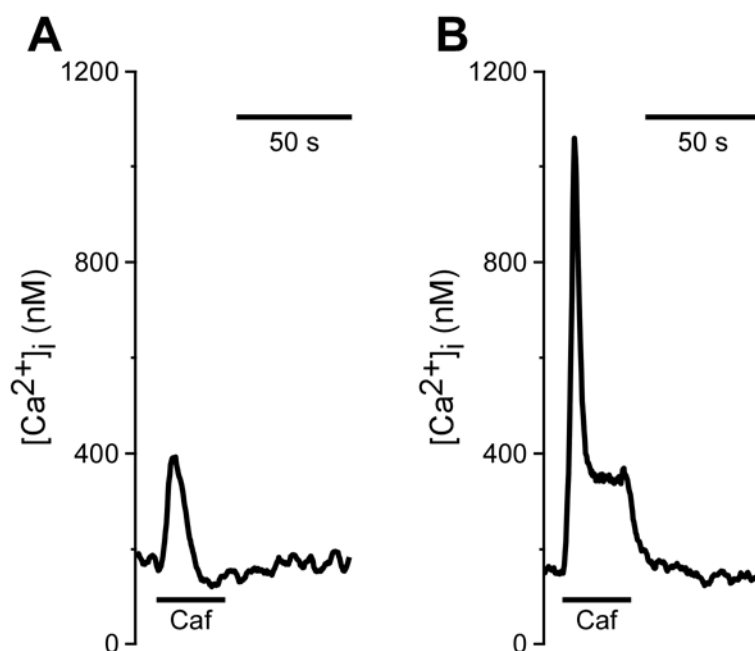


Figura 13. Transitorios de calcio inducidos por la aplicación de cafeína. A, Transitorio de calcio en una célula cromafin con 24 h en cultivo, que se caracteriza por ser de tipo lento y regresa a la basal aún en presencia de cafeína. B, Transitorio de calcio en una neurona simpática, en el cual se puede observar la respuesta de tipo bifásico, primero en forma de espiga y posteriormente en forma de meseta, la cual regresa a la basal en cuanto termina la aplicación de cafeína. La barra de cafeína (Caf) corresponde a una aplicación de 30 s de cafeína 10 mM.

cual se ira liberando conforme aumente el numero de pulsos sin tener un relleno eficiente de los mismos lo que afectará tanto la amplitud como la cinética del transitorio de calcio (Hernández-Cruz, 1997). El análisis que se realizó al transitorio inducido por cafeína es el mismo que se aplicó a los transitorios de calcio inducidos por potasio, esto es, se analizó la amplitud, la derivada, el área bajo la curva y la constante de decaimiento del transitorio.

La figura 14 muestra los resultados obtenidos de medir la amplitud de los transitorios de calcio (la diferencia entre el pico de la $[Ca^{2+}]_i$ y los niveles de la $[Ca^{2+}]_i$ basal), evocados por la aplicación de 10 mM de cafeína. Cabe mencionar que dicha amplitud sólo se midió en aquellas células que respondieron con un incremento por arriba de la basal a la aplicación de cafeína, esta aclaración obedece a que algunas de

las células no daban un aumento en la concentración de calcio y por ende no era posible cuantificar la amplitud del transitorio (p. ej. ver fig. 15B). En la fig 14 podemos observar como en los primeros días de cultivo todas las condiciones experimentales presentan aumentos transitorios de calcio muy discretos, la mayoría en el rango de 50 a 250 nM, y sin presentar diferencias significativas entre ellos ($p>0.33$), y se observa lo mismo a los días cinco y diez en cultivo ($p>0.23$ y $p>0.16$, respectivamente).

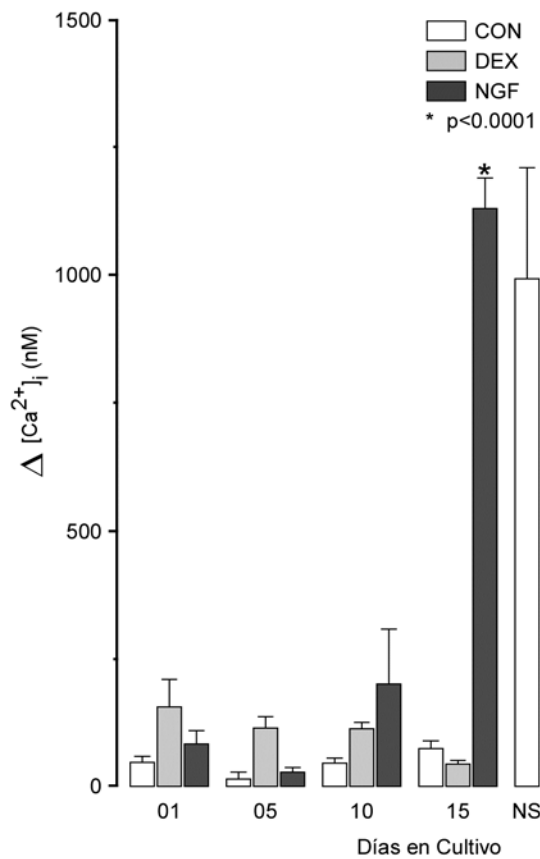


Figura 14. Análisis de la amplitud de los transitorios de calcio inducidos por la aplicación de cafeína. Gráfica de los valores promedio de la amplitud y los errores estándar para cada una de las condiciones de cultivo a los diversos tiempos, se incluye también la amplitud de los transitorios en neuronas simpáticas.

Si analizamos la amplitud con base en el curso temporal por grupos encontramos que en el grupo CON la amplitud de los transitorios durante los 15 días en cultivo siempre se mantiene en un intervalo muy reducido, de 15 a 76 nM (ver tabla 3), y sin presentar diferencias significativas entre ellos ($p>0.68$). En el grupo DEX se observa una tendencia a disminuir progresivamente la amplitud de los transitorios conforme aumentan los días en cultivo (ver tabla 3), de manera que para el día 15 presenta un valor promedio del transitorio de apenas 45 nM, lo cual equivale al 50% del valor de la

basal en el mismo tiempo en cultivo, este dato nos sirve para darnos cuenta de los transitorios tan pequeños que se presentan en este grupo de estudio.

En el caso del grupo tratado con el NGF observamos que hay un comportamiento variable conforme pasan los días en cultivo. En el primer día en cultivo se observa un valor promedio al mostrado en ese día por los distintos grupos (fig 14), es importante hacer notar que ante la aplicación de cafeína en este día de registro la mayoría de las células dieron un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ aunque fuera muy discreto o pequeño (fig 15A). Para el día cinco en cultivo el valor de la amplitud disminuye aproximadamente a un tercio del valor del primer día, esto debido a que muy pocas células respondieron con un aumento de calcio, la gran mayoría no dio respuesta al pulso de cafeína (fig 15B), esta observación no fue exclusiva de las células tratadas con el NGF sino que también en el grupo control se encontró un número importante de células que no respondían, dando registros muy similares al observado en la figura 15B. Para el décimo día en cultivo la liberación de calcio aumenta de manera importante, mas no significativa, con respecto al día uno y cinco, representando un incremento del 140% y 590% respectivamente. Una observación importante de este grupo con 10 días en cultivo es que para este tiempo muchas de las células ya presentan un fenotipo muy similar al de las neuronas simpáticas, y al mismo tiempo algunas células ya empiezan a responder con una amplitud mayor del transitorio inducido por cafeína, esto se puede ver en el valor aumentado de la $[Ca^{2+}]_i$ promedio, el cual se encuentra por arriba de la media de los otros grupos, así como también en un incremento del error estándar, lo que nos habla de la variabilidad dentro de este grupo (ver tabla 3). Esta variación se debe a que hay células que siguen respondiendo con un transitorio pequeño, muy parecido al transitorio de las células con un día en cultivo (fig 15C), mientras que otras células lo hacen con un transitorio mucho mayor (fig 15D), que incluso empieza a adoptar la forma de un transitorio de calcio inducido por cafeína en una neurona simpática (fig 13B).

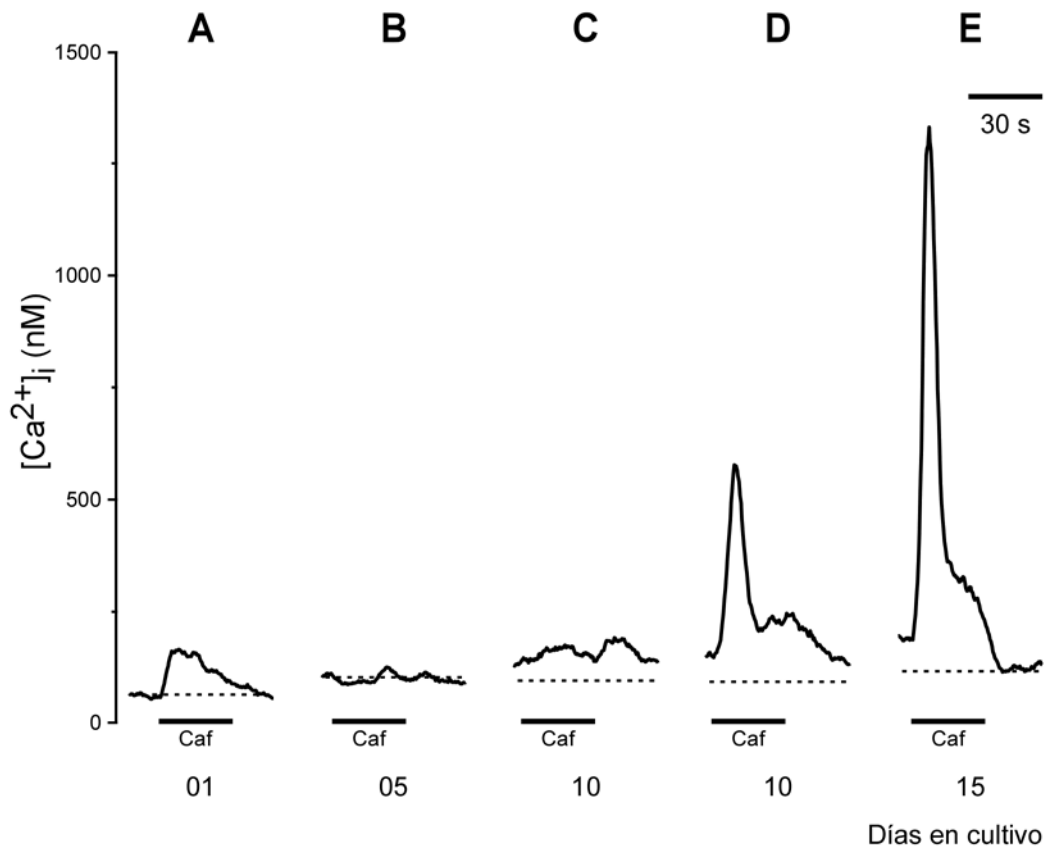


Figura 15. Transitorios de calcio inducidos por aplicación de cafeína a los distintos tiempos en cultivo en el grupo tratado con el NGF. En el día 01 (A) se observan pequeños transitorios de calcio, los cuales tienden a desaparecer para el día 05 (B). Al día 10 en cultivo (C y D) se observan dos tipos de respuestas, sobresaliendo aquellas con un transitorio que ya empieza a adoptar la forma de espiga seguida de una pequeña meseta. Para el día 15 (E) se observa un transitorio bifásico con una espiga y una meseta, respuesta típica de una neurona simpática (ver fig 13B).

A los 15 días en cultivo con el NGF se observa un cambio importante en la amplitud y la cinética de la respuesta a cafeína. Al momento de la aplicación se observa un aumento en el transitorio de calcio dando una respuesta bifásica (fig 15E), siendo la primera fase en forma de espiga y la segunda parte de la respuesta en forma de meseta, muy similar a la presentada por las neuronas simpáticas (fig. 13B). Dicho incremento del transitorio de calcio en valor numérico representa un aumento del 1200% con respecto del mismo grupo al primer día en cultivo y presenta diferencias

significativas con el resto de los grupos a lo largo del cultivo ($p < 0.0001$), lo que nos habla de un cambio radical en el transitorio de calcio.

En la comparación con las neuronas simpáticas el grupo NGF a los 15 días presenta una amplitud mayor, pero sin alcanzar una diferencia significativa entre ambos grupos ($p = 0.19$). Lo que es más notorio, y más importante de señalar, es como el transitorio de las células cromafines neurogenizadas (fig. 15E) tiende a adoptar la forma del transitorio de las neuronas simpáticas (fig 13B), dando también una respuesta de tipo bifásico y presentando una amplitud y cinética muy similares. Esta observación es muy relevante ya que nos indica que las células cromafines, en el proceso de neurogenización, no sólo adoptan la morfología propia de una neurona simpática sino que también sufren cambios en la homeostasis intracelular de calcio que depende de la liberación de calcio de las pozas intracelulares, lo que nos habla de cambios a nivel fisiológico en estas células.

Una comparación de la velocidad de aumento (derivada) de los transitorios de calcio inducidos por cafeína es mostrada en la figura 16. Como en el caso de los transitorios inducidos por potasio (ver potasio figura 11A), los efectos del NGF sobre la movilización del calcio a través de los canales sensibles a cafeína llega a ser más evidente cuando se analiza el pico de la $d[Ca^{2+}]_i/dt$.

El grupo control y el grupo tratado con dexametasona muestran un comportamiento constante durante los 15 días en cultivo, caracterizado por un valor discreto de la $d[Ca^{2+}]_i/dt$ (ver tabla 3), y sin presentar ninguna diferencia significativa en ambos grupos ($p > 0.71$ grupo CON y $p > 0.84$ grupo DEX), lo que nos habla de que en estas células durante el tiempo en cultivo no se alteraron significativamente los mecanismos por los cuales se da la liberación de calcio de los reservorios intracelulares ya que la velocidad de aumento se mantuvo constante.

El grupo tratado con el NGF al día 01, 05 y 10 muestra un patrón similar al de los grupos CON y DEX, se observa un aumento muy discreto de la $d[Ca^{2+}]_i/dt$ y no presenta diferencias significativas con los otros grupos ($p > 0.49$). Después de una exposición prolongada al NGF (15 días) la forma de la respuesta a cafeína por parte de las células cromafines llega a ser casi idéntica a la de las neuronas simpáticas. Estas

modificaciones en la cinética de los transitorios inducidos por cafeína se reflejan en la primera derivada (ver fig. 16), dando un aumento del 2400% si se compara con el grupo CON y de un 1100% si se compara con el primer día del grupo tratado con NGF, lo que nos indica que los mecanismos que participan en el proceso de liberación del calcio de las pozas intracelulares a través de los receptores sensibles a cafeína se encuentran aumentados y con ello se da un incremento en la velocidad con la que se libera el calcio al citosol. Si comparamos los datos obtenidos del grupo NGF a los 15 días en cultivo

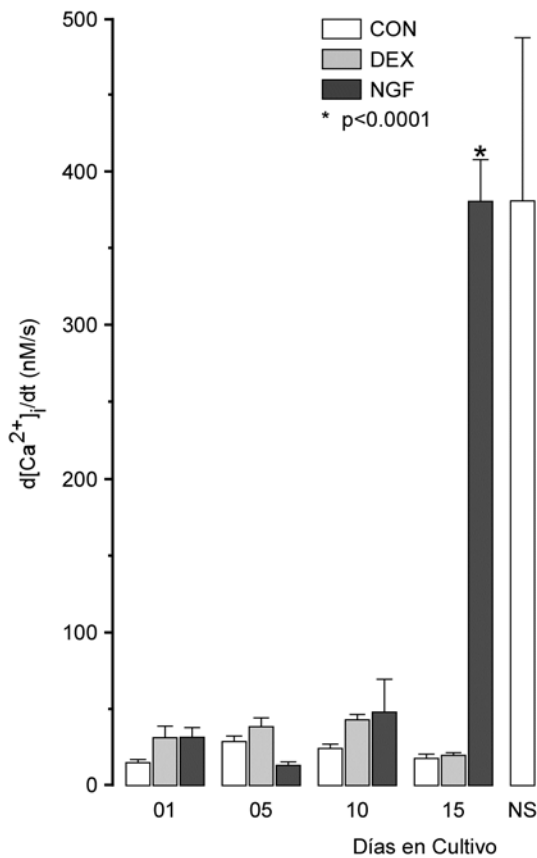


Figura 16. Derivada de los transitorios de calcio inducidos por cafeína en células cromafines bajo diversos tratamientos a los distintos tiempos en cultivo. Se muestra también la derivada de los transitorios en neuronas simpáticas.

con los datos de las neuronas simpáticas encontramos que estos son prácticamente idénticos ($p=0.99$, ver tabla 3), tanto en la forma como en los parámetros cinéticos de la respuesta, lo que nos dice que la velocidad con la cual aumenta la concentración de calcio en ambos tipos celulares es similar.

Un dato interesante que se encontró en el registro de los transitorios de calcio, a los 05 días de cultivo, fue la disminución del valor promedio de los transitorios tanto en el grupo control como en el grupo tratado con el NGF (ver fig. 14), aunque esta reducción no es estadísticamente significativa ($p=0.63$), debido a la variabilidad y al pequeño número de los casos, esto nos conllevó a realizar un análisis más detallado de este fenómeno, encontrando a primera vista que en algunas células la aplicación de cafeína induce un transiente inhibitorio de la liberación de calcio, en especial en la primera semana de cultivo de las células.

Para evaluar de manera más exacta esta característica los datos fueron analizados con el fin de determinar el área bajo la curva de los transitorios de calcio inducidos por cafeína, esto es, calcular la integral en un lapso de 30 seg., (duración del pulso de cafeína) y con ello poder conocer la cantidad total de calcio que se movilizó en el citosol durante ese periodo de tiempo, este parámetro nos provee de información sobre la cantidad total de calcio liberada por unidad de tiempo, este dato fue obtenido por la integración digital de los transitorios de calcio.

En la figura 17A se resumen los resultados de este análisis. Sorprendentemente, los resultados obtenidos de los registros del grupo CON muestran que, en promedio, la integral temporal de la respuesta a cafeína fue inicialmente positiva ($316 \pm 291.1 \text{ nM*s}$, $n=19$), llegando a ser negativa después de 5 y 10 días en cultivo (-1595.1 ± 449.2 , $n=26$ y -325.3 ± 245.2 , $n=23$, respectivamente), aunque estos valores no son significativamente diferentes ($p=0.18$ y $p=0.66$, respectivamente), debido a la gran variabilidad. Los valores negativos de la integral son explicados en un buen número de trabajos, en los cuales se reporta que la cafeína más que un aumento en el calcio, produce un incremento transitorio discreto seguido por una reducción, o bien presentando una reducción sostenida por debajo de la línea basal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En la figura 17B se muestran ejemplos de los distintos transitorios que se encontraron a lo largo del cultivo del grupo control. En estos ejemplos se observa claramente el transitorio inhibitorio asociado con el pulso de cafeína (5 y 10 días de cultivo), así como una respuesta discreta en forma de espiga que posteriormente disminuye por debajo de la basal (15 días). Estas respuestas paradójicas estuvieron presentes desde el primer día en cultivo del grupo CON (31% de las células), llegando a ser más frecuentes a los 5 días (77% de las células), y disminuyendo gradualmente (43% al décimo día), hasta

que estas desaparecen completamente al día 15 en cultivo, siendo esta la razón por la cual los promedios en los días 5 y 10 son negativos en el grupo CON.

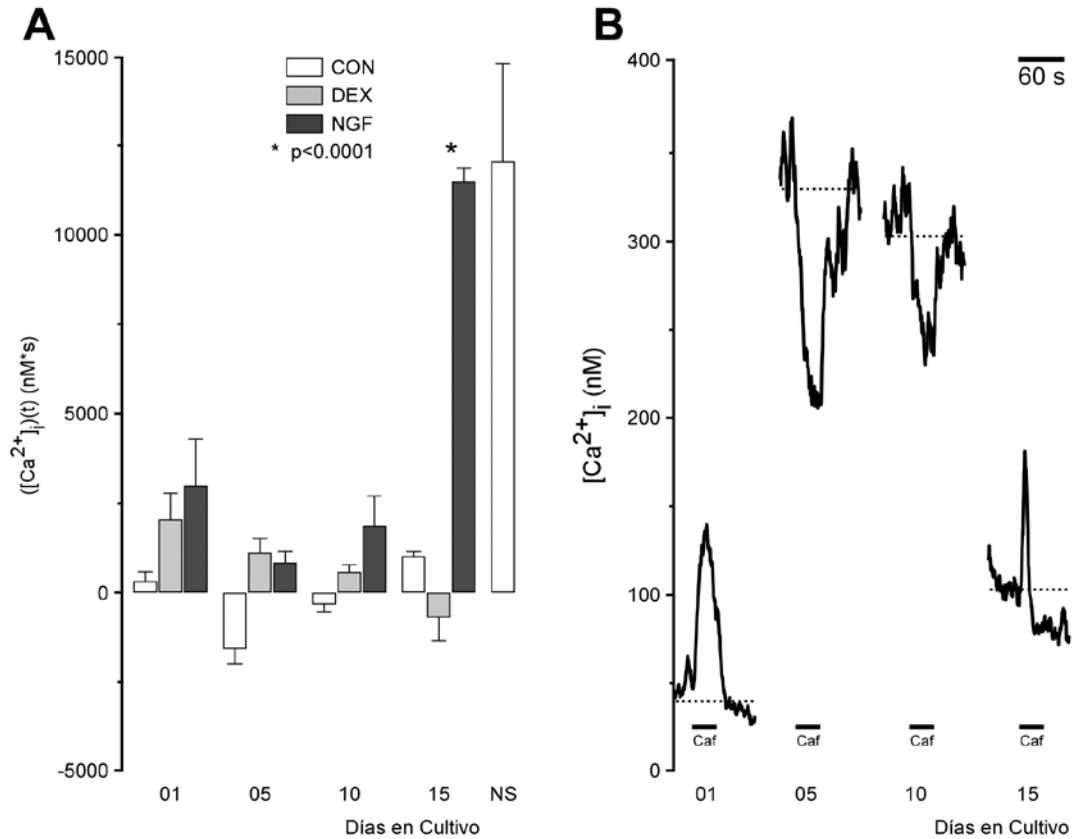


Figura 17. Área bajo la curva de los transitorios de calcio inducidos por cafeína. Se calculó la integral de los transitorios de las células cromafines bajo diversos tratamientos a los distintos tiempos en cultivo. A, Media del área de los transitorios. Es importante notar aquellos casos en que se observan valores negativos (para explicación ver texto). B, Trazos representativos del grupo control a los distintos tiempos. Se observa la disminución de calcio por efecto de la aplicación de cafeína durante 30 s. La línea punteada representa el valor promedio de la basal.

Los registros obtenidos en el grupo DEX son algo diferentes a los del grupo CON. La integral temporal de los transitorios de calcio se encuentra aumentada el primer día de cultivo y decrece a los 5 y 10 días de cultivo tornándose negativa después de 15 días en cultivo. Esta disminución progresiva en la integral obedece a que conforme avanzan los días en cultivo las células expuestas a la dexametasona van

disminuyendo su capacidad de responder a la cafeína, lo cual se visualiza claramente en la amplitud de los transitorios inducidos por cafeína (fig 14 y fig 17A), los cuales son cada vez menores conforme aumentan los días en cultivo, pero sin llegar a presentarse los transitorios inhibitorios observados en las células del grupo control (fig 17B) a los 5 y 10 días del cultivo. En el caso del cultivo a los 15 días se observan algunos transitorios inhibitorios de muy poca amplitud, sólo 6 células de 17 (35%) presentaron un valor de calcio por debajo de la basal al aplicárseles la cafeína, pero estos valores fueron suficientes para dar un promedio negativo en el análisis de este grupo (-702.3 ± 668.7).

De las células tratadas con el NGF encontramos que el primer día en cultivo muestran un promedio mayor al grupo CON y DEX (ver tabla 3) pero sin presentar diferencias significativas con estos grupos ($p > 0.1$), para el día 5 en cultivo este grupo también presentó una disminución del valor promedio del área bajo la curva, esto se explica por que algunas células dan una respuesta pequeña, mientras que otras están ausentes de respuesta ante el pulso de cafeína (fig 15B), y aunque se observa una ligera recuperación al décimo día esta no es significativa ($p > 0.5$), a pesar de encontrarse algunas respuestas que ya muestran un patrón característico de la respuesta a cafeína (fig 15D) observada a los 15 días por este mismo grupo (fig 15E). Cabe mencionar que en este grupo experimental sólo en el quinto día en cultivo se encontraron los transitorios inhibitorios a la aplicación de cafeína en tres células de 17 (17%), debido a esto el promedio de la integral en este punto de la gráfica es el más bajo de este grupo, pero sin presentar valores negativos o alguna diferencia significativa con los días 1 y 10 ($p > 0.15$), por eso aunque disminuye el valor del calcio transitoriamente este nunca alcanza valores cercanos a cero o negativos (ver tabla 3).

Para el día 15 en cultivo se observa un incremento drástico en el área bajo la curva de las células tratadas con el NGF. Este aumento, de casi un 300% con respecto del primer día en cultivo, se encuentra caracterizado por el hecho de que el transitorio de calcio es muy parecido al que presentan las neuronas simpáticas a la aplicación de cafeína (fig 13B vs fig 15E), en el cual se observan los dos componentes de dicha respuesta, en primer termino un transitorio rápido en forma de espiga seguido por un transitorio sostenido en forma de meseta, el cual desaparece al suspender la aplicación de cafeína. Si comparamos el valor de la integral en el grupo NGF a los 15 días con el valor de las neuronas simpáticas podemos observar que son muy similares entre si

($p=0.7$), lo cual viene a reforzar lo observado a lo largo del análisis de los transitorios inducidos por cafeína.

Este proceso de liberación de calcio de las pozas intracelulares por parte de las neuronas simpáticas ya fue estudiado y descrito en trabajos previos (Hernández-Cruz y col., 1997), y apoyados en este reporte podemos decir que los mecanismos de liberación de calcio de las pozas intracelulares en células cromafines neurogenizadas por efecto del NGF son muy similares a los mecanismos presentes en las neuronas simpáticas.

Por último, y para completar el estudio de los transitorios inducidos por cafeína, se analizó el valor de la constante de decaimiento (τ) en el transitorio del grupo NGF a los 15 días y el de las neuronas simpáticas, para compararlos y ver si son similares.

En la figura 18 se observa la grafica de estos valores para los dos grupos, como podemos observar el valor de la τ para ambos grupos es similar, lo que nos indica que los mecanismos de remoción de calcio también se tornan parecidos en estos grupos al igual que sucede con la τ en el caso de la remoción de calcio después de un pulso de potasio (ver tabla 2 y fig 12).

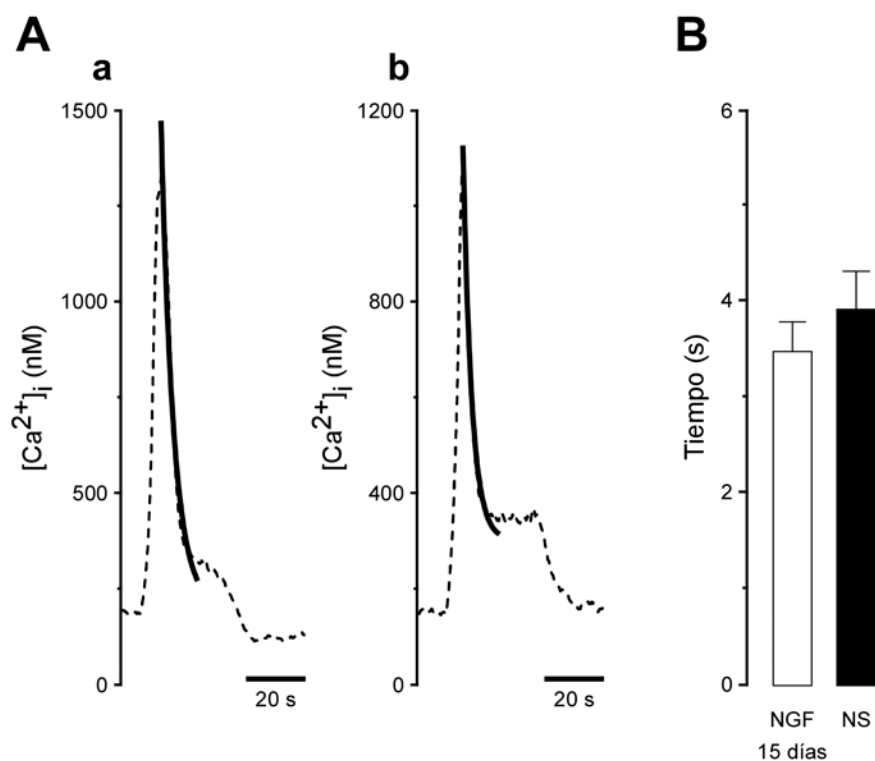


Figura 18. Constante de decaimiento (tau) de los transitorios de calcio inducidos por cafeína. A, Trazos representativos de la exponencial de primer orden en una célula cromafín neurogenizada Aa, y de una neurona simpática Ab. B, Valores promedio de la tau en células tratadas con NGF a los 15 días de cultivo y de las neuronas simpáticas (NS).

	Días en Cultivo	n	Amplitud	Derivada	Área	Tau
CON	01	19	34.4 ± 11.8	15.1 ± 2.1	316 ± 291	S/D
	05	26	15.9 ± 13.8	28.9 ± 3.1	-1595 ± 449	S/D
	10	23	47.3 ± 9.8	24.6 ± 2.8	-325 ± 245	S/D
	15	09	75.9 ± 14.6	18.0 ± 2.6	1038 ± 148	S/D
DEX	01	06	156.5 ± 52.3	31.7 ± 7.3	2117 ± 760	S/D
	05	17	115.7 ± 22.3	38.6 ± 5.7	1150 ± 431	S/D
	10	16	114.0 ± 13.0	43.4 ± 3.4	591 ± 206	S/D
	15	17	44.9 ± 7.9	19.9 ± 1.6	-702 ± 668	S/D
NGF	01	08	84.9 ± 26.3	31.9 ± 6.2	3072 ± 1343	S/D
	05	17	29.2 ± 8.2	13.7 ± 2.1	861 ± 337	S/D
	10	08	201.4 ± 108.0	48.1 ± 21.8	1921 ± 869	S/D
	15	11	1129.6 ± 60.2	380.6 ± 27.3	11844 ± 400	3.34 ± 0.30
NS	<3	16	991.8 ± 216.7	380.7 ± 106.3	12421 ± 2835	3.88 ± 0.39

Sección V: Cambios en la expresión del receptor de rianodina en células cromafines expuestas al factor de crecimiento nervioso.

El receptor intracelular sensible a rianodina (RyR) se encuentra distribuido en distintos órganos, y en algunos casos esta distribución es un indicativo de su correlación con determinadas funciones (Sutko, 1996; Takeshima, 1993). El RyR tipo 1 fue el primero en caracterizarse, describiéndose su presencia en el músculo esquelético, principal lugar donde se expresa y donde se puede encontrar en grandes cantidades, de ahí deriva su nombre como receptor de rianodina esquelético; el RyR tipo 2 se identificó y caracterizó en músculo cardíaco, por lo que se le denomina como RyR cardíaco; y el tercer tipo de receptor o RyR-3 se identificó en cerebro por lo que se le dió el nombre de receptor de rianodina cerebral (Takeshima, 1993). Pero a la fecha se ha reportado que los tres subtipos de receptores de rianodina se expresan en otros tejidos distintos de los que fueron descritos inicialmente, por ejemplo el RyR-1 se expresa en hígado y en células de purkinje en cerebelo; el receptor tipo 2, además de corazón, se encuentra principalmente en cerebro y en músculo liso, mientras que el receptor tipo 3 se encuentra distribuido de manera heterogénea en distintos órganos como son: riñón, pulmón, estómago, intestino, testículo, glándulas adrenales y ovario (Giannini, 1995; Takeshima, 1993).

En el caso de las células cromafines el estudio de la liberación intracelular de calcio conllevó a la descripción de la presencia de los dos tipos de receptores intracelulares, tanto el de inositol trifosfato (IP_3) como el de rianodina (Malgaroli, 1990), pero desde sus primeras descripciones a la fecha sólo se han descrito de manera genérica, sin detallar el subtipo de receptor de IP_3 o más en específico de rianodina presentes en estas células. Respecto a las neuronas simpáticas la descripción de los mecanismos de liberación de calcio mediada por receptores a rianodina indicaban la posibilidad de que fuera el receptor tipo 2 el involucrado en este proceso, ya que la liberación de calcio que se presenta en estas células es conocida como liberación de calcio inducida por calcio, típica de los RyR-2 (Kuba, 1994; Verkhatsky, 1996; Hernandez-Cruz, 1997).

Como se demostró en la sección anterior las células cromafines modifican su patrón de liberación del calcio intracelular conforme adoptan un fenotipo neuronal, lo

que puede ser un indicativo de que también hay cambios en la expresión de los canales intracelulares que liberan calcio. En particular nos avocamos a investigar la presencia del receptor sensible a rianodina, ya que los experimentos hechos con cafeína apuntan directamente a este receptor como el responsable del cambio en la cinética de la liberación de calcio, por lo que resulta de suma importancia investigar su expresión durante el proceso de transdiferenciación de las células cromafines.

Como una primera aproximación se utilizó rianodina acoplada a fluoresceína para observar la presencia o ausencia del receptor de rianodina en las células de estudio. Como se puede ver en la figura 19 las células cromafines con un día en cultivo presentan muy poca fluorescencia, lo que nos indica que esta población expresa el receptor de rianodina en cantidades mínimas, que incluso pueden ser indetectables por esta técnica, mientras que las células neurogenizadas con 15 días en cultivo aumentan de manera importante la expresión de dicho receptor, siendo comparable con la expresión del receptor en las neuronas simpáticas. Estos experimentos nos permiten ver, de manera cualitativa, que sí se presenta un cambio substancial en la expresión del receptor de rianodina durante el proceso de neurogenización de las células cromafines por efecto del NGF.



Figura 19. Expresión del receptor de ryanodina en células cromafines y en neuronas simpáticas. Imágenes de microscopía confocal. Como marcador se utilizó la rianodina acoplada a fluoresceína.

El siguiente punto a desarrollar en estos experimentos fue determinar el curso temporal de la expresión del receptor durante el tiempo que permanecen las células en

cultivo, con el fin de observar si hay un tiempo crítico para el aumento en la expresión de dicho receptor o si este incrementa su expresión de forma gradual con respecto del tiempo en cultivo. Para lograr esto se utilizó de nuevo la rianodina acoplada al fluoróforo, y se tomaron las imágenes con los mismos parámetros que para la figura 19. En la figura 20 se resume el curso temporal de dicha expresión, como podemos observar en las imágenes de contraste de fases conforme aumentan los días en cultivo, en presencia del NGF, hay un cambio en el fenotipo de las células, adoptando un fenotipo similar al de una neurona simpática, y de la misma manera al observar las imágenes correspondientes a la fluorescencia podemos ver como aumenta el marcado por la rianodina fluorescente, lo que se puede interpretar como un aumento gradual y progresivo en la expresión del receptor de rianodina durante la neurogenización de las células cromafines, y si comparamos con las neuronas simpáticas podemos ver que prácticamente no hay diferencias ni en el fenotipo celular así como en la expresión del receptor de rianodina.

Los resultados presentados en las figuras 19 y 20 nos permiten concluir, de una manera cualitativa, que durante el proceso de neurogenización se da un aumento gradual en la expresión del receptor de rianodina, y que dicho aumento está íntimamente relacionado con la adopción del fenotipo neuronal, y que se puede vincular también con el cambio en la dinámica de liberación de calcio por efecto de la cafeína. En el caso del grupo control y el grupo dexametasona no se realizaron este tipo de experimentos ya que como se mencionó al inicio esto es solamente una aproximación al estudio de la expresión de dicho receptor, pero el estudio en estos grupos se abordará en los siguientes experimentos.

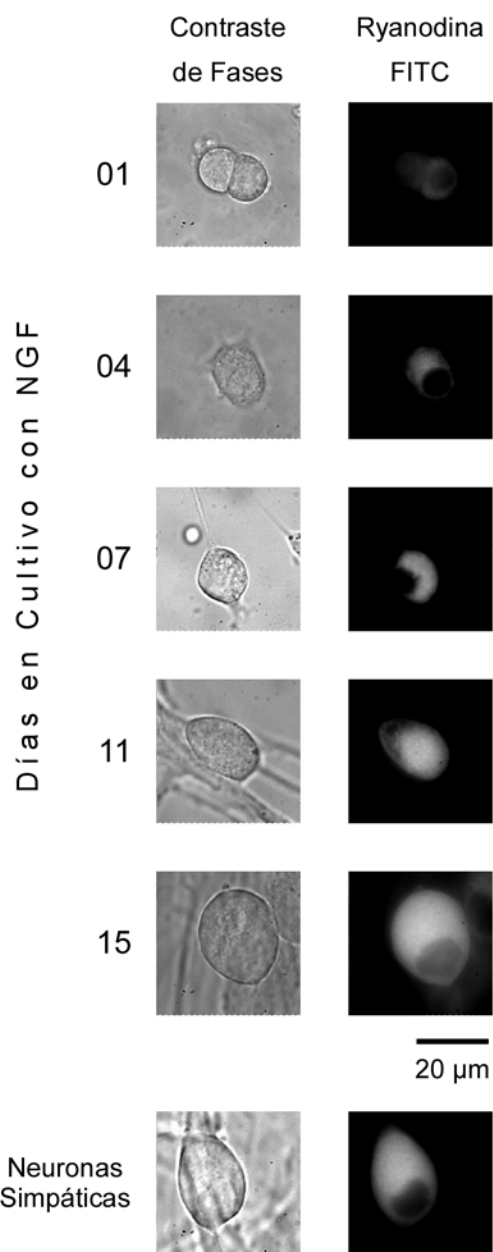


Figura 20. Curso temporal de los cambios fenotípicos, así como de la expresión del receptor de rianodina en células cromafines a distintos días de cultivo con el NGF y su comparación con una neurona simpática.

Hasta este punto podemos hablar del aumento en la expresión del receptor a rianodina, pero estos experimentos no nos permiten diferenciar entre el subtipo de receptor que esta aumentando, o si aumentan los tres subtipos de receptores. Para poder diferenciar entre la expresión de cada uno de los subtipos se procedió a realizar técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra los tres subtipos de

receptores de rianodina, estos anticuerpos fueron amablemente proporcionados por el Dr. Anthony Lai, de la Universidad de Wales en el Reino Unido.

Para el análisis cuantitativo de la expresión de los subtipos del receptor de rianodina se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (ver materiales y métodos). Cabe mencionar que se incluyó, como control negativo, el estudio de la expresión de dichos receptores en la línea celular de ovarios de hámster chino (CHO), de la cual se sabe que carecen de los canales intracelulares sensibles a rianodina. Para estos experimentos se consideraron los grupos CON, DEX, NGF y neuronas simpáticas. En una primera serie de experimentos se tomaron únicamente los cultivos de estos grupos al primer día y al día 15.

En la figura 21 se presentan los resultados de la expresión de los subtipos del receptor de rianodina en las diferentes condiciones. En el panel 21A podemos observar la expresión del subtipo 1, del cual se observa que la expresión al primer día en cultivo es el doble o el triple que en el caso control (células CHO) en todas las condiciones, pero a los 15 días de cultivo se observa que disminuye su expresión en un 50% (grupo NGF), o en un 70-75% (grupo CON y DEX) con respecto al primer día en cultivo. En todos los grupos se encontraron diferencias significativas entre el primer día y el día 15 ($p < 0.0001$) lo que nos indica que la disminución de la expresión del receptor de rianodina tipo 1 puede ser un efecto directo del tiempo en cultivo de las células.

En el caso de la expresión del receptor tipo 2, (panel 21B) los valores observados el primer día en todas las condiciones de cultivo es muy similar al nivel presentado por las células CHO ($p \geq 0.2$), este resultado nos indica que las células cromafines, al inicio del cultivo, prácticamente no presentan el RyR-2 e incluso en el caso de los grupos control y dexametazona sólo aumenta ligeramente (25 y 20% respectivamente) después de 15 días en cultivo, presentando apenas diferencias significativas (CON, $p = 0.04$; DEXA $p = 0.038$). En el grupo sometido al tratamiento con NGF la expresión es muy distinta, al inicio se comporta de manera similar al grupo CON y DEXA, pero después de los 15 días en cultivo tiene un aumento del 400% en la expresión de receptor tipo 2, este dato es de mayor relevancia si lo comparamos con la expresión de este receptor en las neuronas simpáticas, en donde observamos que

prácticamente son similares los niveles de expresión, sin presentar diferencias significativas ($p=0.3$).

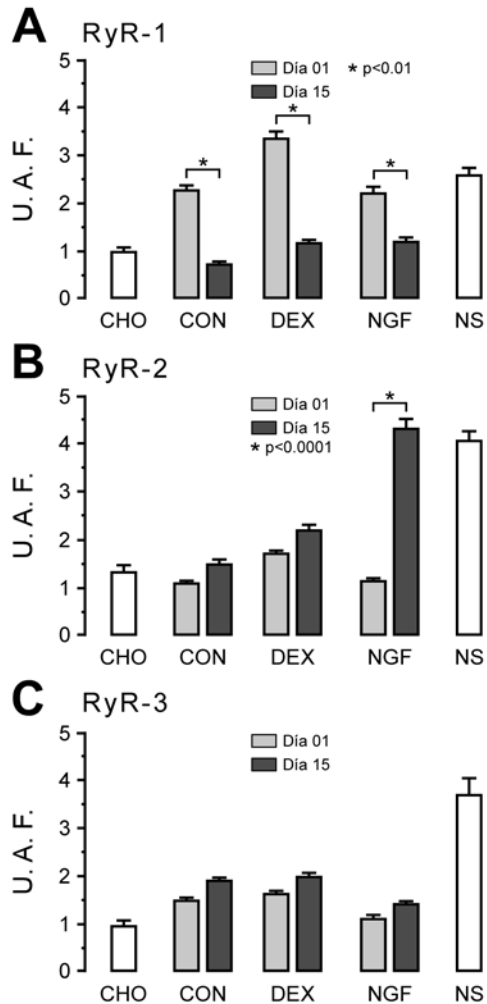


Figura 21. Expresión de los distintos subtipos del receptor de ryanodina en células cromafines en las distintas condiciones de cultivo, solo se analizaron los cultivos al primer día y a los 15 días, se gráfica también la expresión de dicho receptor en neuronas simpáticas (N.S.) con fines comparativos. **A**, Receptor de Ryanodina tipo 1 (**RyR-1**); **B**, Receptor de Ryanodina tipo 2 (**RyR-2**) y **C**, Receptor de Ryanodina tipo 3 (**RyR-3**).

Referente a la expresión del tipo 3 del receptor a rianodina podemos observar (fig. 21C) que tanto la expresión al inicio del cultivo como a los 15 días se mantiene constante, si bien se presenta un ligero aumento en las tres condiciones experimentales dicho incremento sólo presenta diferencias discretas sin llegar necesariamente a ser significativas ($0.03 < p < 0.06$).

Si revisamos el caso de las neuronas simpáticas en estos experimentos podemos observar que en la expresión de los tres subtipos de receptores, sólo en el

caso del tipo 2 y del tipo 3 hay una diferencia significativa importante con respecto de las células cromafines al inicio del cultivo (400% y 250% mayor respectivamente, $p < 0.0001$), mientras que en el caso del RyR1 la expresión de este receptor no cambia significativamente ($p = 0.1$), lo que nos indica que las neuronas simpáticas expresan principalmente los subtipos 2 y 3 del receptor a rianodina, mientras que se encuentra ausente el subtipo 1. Si lo analizamos estadísticamente, entre la expresión del subtipo 2 y 3 no hay diferencias significativas ($p = 0.32$), pero si se encontraron diferencias de estos con la expresión de subtipo 1 ($p < 0.001$).

Con estos experimentos podemos concluir que el único subtipo del receptor de rianodina que cambia por efecto de las condiciones experimentales, de manera importante y concordante con la expresión en neuronas simpáticas, es el subtipo 2 en las células cromafines que son tratadas con el factor de crecimiento nervioso. Con base en esto procedimos a explorar el desarrollo temporal del aumento del RyR2 en las células cromafines con NGF.

De manera similar se cuantificó la expresión de este subtipo en las células control y en las expuestas a dexametazona, pero no se encontraron cambios importantes durante los 15 días que permanecieron en cultivo las células cromafines.

Los efectos del NGF sobre la expresión de dicho receptor en las células cromafines en cultivo lo podemos ver en la figura 22. Al inicio del cultivo mantiene niveles similares a las células CHO, esto indica que prácticamente no hay expresión del receptor en las células cromafines, con respecto de las CHO ($p = 0.5$), pero a partir del día 5 se observa un incremento gradual en la expresión del receptor, observándose diferencias significativas a partir de esta fecha ($p < 0.002$ en todos los casos). Si comparamos el incremento de la expresión al día 15 con respecto del primer día, encontramos que la expresión aumenta en un 384% (1.11 vs 4.27), este incremento en la expresión alcanza niveles similares e incluso mayores que la expresión del RyR2 en las neuronas simpáticas, inclusive no hay diferencias significativas entre las células con NGF por 15 días y las neuronas ($p = 0.4$). Como dato adicional se cuantificó la expresión de este receptor en células con 20 días de cultivo en presencia del NGF, se observó que el aumento en la expresión continua, incluso por encima del valor de las neuronas simpáticas, siendo un 45% mayor (5.81 ± 0.28 vs 4.02 ± 0.2). Con este resultado

podemos concluir que el NGF incrementa de manera gradual y progresiva la expresión del receptor a rianodina tipo 2 alcanzando niveles similares a los expresados por las neuronas simpáticas con 2-3 días de cultivo.

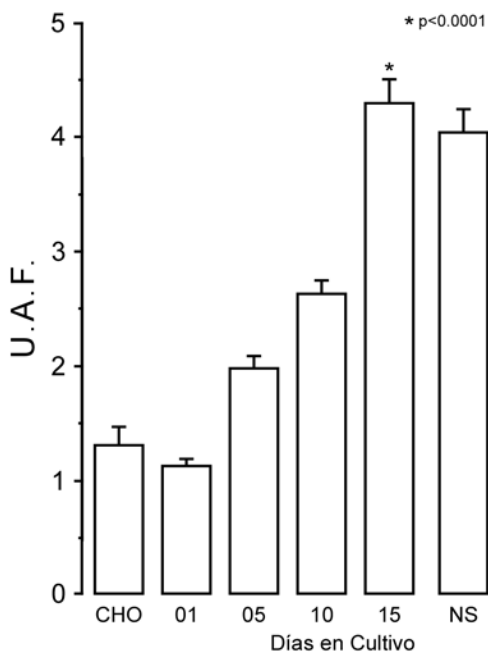


Figura 22. Curso temporal de la expresión del receptor de rianodina subtipo RyR-2 en células cromafines en cultivo en presencia del FCN, en neuronas simpáticas (NS) y en células CHO (CHO). U.A.F. = Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

Otro dato importante que podemos obtener a partir de estos resultados es la correlación que existe entre la expresión del receptor a rianodina y la liberación del calcio de las pozas intracelulares, por efecto de la cafeína, en las células cromafines. Para observar esto combinamos la gráfica de la expresión del receptor a rianodina tipo 2 (fig 22) con la gráfica de los patrones de respuesta de calcio inducidos por cafeína (fig 15). En esta gráfica combinada (fig 23) podemos observar como en los primeros días de cultivo prácticamente no hay liberación de calcio de las pozas intracelulares, día 01 y 05, observándose que la expresión del RyR-2 es nula (día 01) o hay muy baja expresión (día 05), mientras que al día 10 y 15 observamos como aumenta tanto la liberación de calcio como la expresión del RyR2, alcanzando para el día 15 valores de expresión muy similares a las neuronas simpáticas y de manera muy importante podemos observar como también el patrón de liberación de calcio es muy similar al de las neuronas simpáticas, presentando las dos fases que se han descrito en estas ultimas, tanto la de espiga como la de meseta.

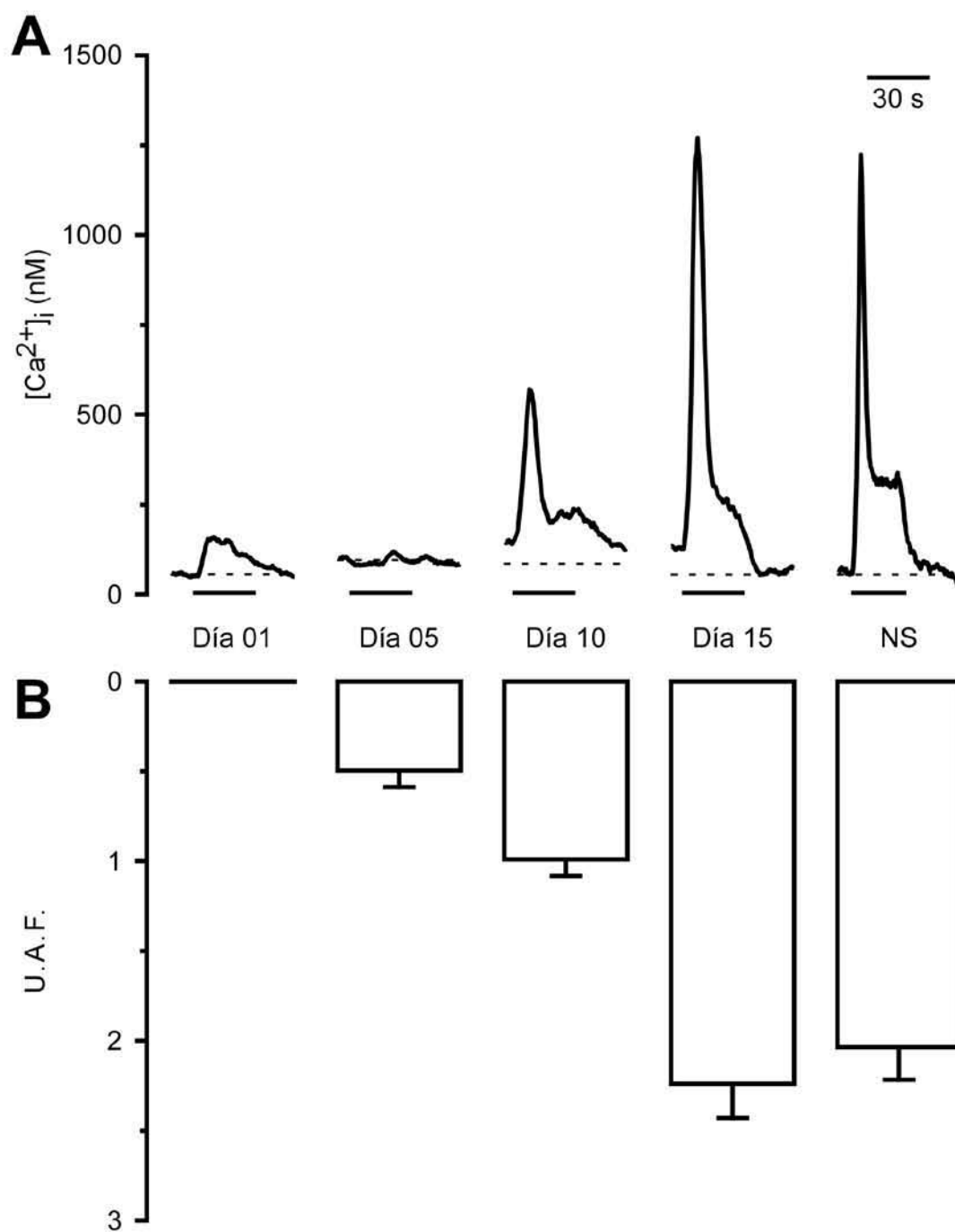


Figura 23. Comparación de los patrones de secreción de calcio por las pozas intracelulares ante un pulso de cafeína (panel A) y la expresión del receptor a ryanodina subtipo RyR-2 (panel B) en células cromafines a distintos días de cultivo en presencia del FCN, se gráfica también la respuesta y expresión de las neuronas simpáticas. Las barras sólidas debajo de los trazos del panel A representan la duración del pulso de cafeína. U.A.F. = Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

DISCUSION.

La homeostasis y la dinámica del calcio en las células excitables están determinadas principalmente por la naturaleza y la distribución de proteínas con funciones específicas en el manejo del Ca^{2+} , tales como los canales de calcio, los buffers y las bombas de calcio, a la fecha se sabe muy poco sobre los factores que influyen en la expresión temporal de estas proteínas tanto en el desarrollo como en las neuronas maduras de los vertebrados.

En este estudio se intenta revisar los efectos del NGF sobre las células cromafines de animales en etapa postnatal y con ello evaluar los posibles cambios en la homeostasis de calcio asociada con la expresión de genes que le permiten a la célula cromafin adquirir un fenotipo neuronal.

Perfiles característicos de la homeostasis y dinámica de calcio en células cromafines y en neuronas simpáticas.

Los niveles basales de calcio en las células cromafines se encontraban ligeramente elevados, al igual que en neuronas simpáticas postnatales. Estos hallazgos están acordes con reportes en donde la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo incrementa después de 24 horas de tratamiento con en NGF en NS de ratas neonatos. (Itoh, 1998). El NGF también incrementa los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en células PC12 (Bush, 1991). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal de neuronas en desarrollo, que se derivan de las crestas neurales, también incrementa gradualmente durante su maduración (Koike, 1991), esto es, que las células cromafines mimetizan a las neuronas simpáticas inmaduras.

Las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tanto espontáneas como inducidas por un agonista, las cuales son características de las células cromafines (Malgaroli, 1991; D'Andrea, 1993), dependen de la liberación del calcio desde los reservorios intracelulares sensibles al IP3 y posiblemente de la entrada de calcio (D'Andrea, 1996). En este estudio demostramos que las fluctuaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fueron frecuentes en las células cromafines y prácticamente ausentes en las neuronas

simpáticas. De acuerdo con esto, la varianza sobre la media basal de la $[Ca^{2+}]_i$ fue siete veces más elevada en las células cromafines que en las neuronas simpáticas. Esta propiedad de las NS para mantener niveles bajos de la $[Ca^{2+}]_i$ ha sido previamente reportada (Itoh, 1998), aunque estas pueden disparar oscilaciones espontáneas de calcio si la sensibilidad de los canales que liberan calcio, tipo rianodina, se ve incrementada (Malgaroli, 1990; Friel, 1992; Nohmi, 1992; Kuba, 1994; Itoh, 1998 y Usachev, 1999).

Las neuronas simpáticas y las células cromafines muestran importantes diferencias en la magnitud, velocidad de aumento y decaimiento de los transitorios de calcio inducidos por una despolarización de la membrana plasmática. Esta respuesta fue 3.3 veces mas grande, se desarrollo 5.3 veces mas rápida y decayó aproximadamente 2 veces mas rápido en NS comparadas con las células cromafines (Ver tabla 1). Además, la movilización de calcio inducida por cafeína fue 28 veces más grande y se desarrollo 25 veces más rápida en NS que en células cromafines (ver tabla 1). También, las respuestas a cafeína fueron más pequeñas y con forma de meseta en las células cromafines, mientras que estas fueron más grandes e involucraron componentes transitorios y de liberación sostenida en las NS.

Las bases para estas diferencias en la dinámica y la homeostasis de calcio podrían residir en la expresión diferencial de los canales de calcio voltaje dependientes, reservorios intracelulares de calcio sensibles a cafeína y en el secuestro de calcio y su amortiguación por proteínas citoplasmáticas. Estas propiedades, las cuales se desarrollan autónomamente en las células cromafines y en las neuronas simpáticas, probablemente tienen funciones particulares en ambos tipos de células. Por ejemplo, las oscilaciones espontáneas de calcio pueden explicar el alto nivel de secreción de catecolaminas no estimulada, típico de las células cromafines (Malgaroli, 1991). Sin embargo, como se demuestra en este estudio, el patrón de la homeostasis y dinámica de calcio en células cromafines postnatales es plástico, esto es, sus características no son irreversiblemente determinadas.

El abatimiento de las fluctuaciones espontáneas de calcio en células cromafines.
¿Un indicador de la diferenciación neuronal?

A los cinco días de cultivo, las células cromafines del grupo control incrementaron tanto sus niveles basales de la $[Ca^{2+}]_i$, así como la frecuencia y la amplitud de las fluctuaciones espontáneas. Después de este aumento inicial, la actividad espontánea disminuye hasta que prácticamente desaparece a los 15 días de cultivo. Mas allá de los mecanismos que se involucran en la terminación natural de las fluctuaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ ya se ha demostrado que el NGF también inhibe estas oscilaciones, posiblemente por que promueve la remoción de calcio. Esto no fue aparente a los 5 días en cultivo, mientras que el NGF casi desaparece la actividad oscilatoria aumentada observada en las células cromafines control (fig 1b). En esta observación es interesante que el NGF también suprime las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en neuronas simpáticas inmaduras después de la estimulación con cafeína (Itoh, 1998). La pérdida de las fluctuaciones espontáneas en células cromafines puede ser la primera indicación de una reorganización de la homeostasis de calcio intracelular con miras hacia una restructuración con un fenotipo parecido a una neurona simpática.

Las bases del aumento de los transitorios de calcio dependientes de voltaje inducido por el NGF en células cromafines.

La amplitud y velocidad del aumento de los transitorios de calcio, en células cromafines, inducidos por una despolarización incrementa gradualmente en presencia del NGF. Estos cambios están mas relacionados con el aumento en la densidad de los CCVD inducida por el NGF, reportado para las células cromafines (Morgado-Valle, 1998). En ese estudio la densidad de las corrientes de calcio aumento 2.9 veces después de una semana de tratamiento con el NGF, comparado con el grupo control. Si asumimos que el punto máximo de la derivada de la concentración de calcio, con respecto al tiempo, de los transitorios de calcio refleja mas fielmente la medida de lo que indica la entrada de calcio, el incremento en la densidad de la corriente se compara favorablemente con el aumento de 5.3 veces en la derivada del calcio después de 15 días de exposición al NGF (ver tabla 1). Sin embargo, la magnitud y la cinética de los transientes de calcio voltaje dependientes no dependen exclusivamente del influjo de

calcio, sino que también interactúan con la liberación del calcio de los reservorios intracelulares, así como de su remoción. De esta manera, las alteraciones en la contribución relativa de estos mecanismos no pueden ser afirmadas a priori.

La tasa de decaimiento de los transitorios de calcio inducidos por potasio incrementa después del tratamiento con el NGF, sugiriendo que la remoción rápida del calcio del citosol llega a ser más eficiente. Estos hallazgos nos indican la posibilidad de que el mejoramiento de los transitorios de calcio dependientes de voltaje resultan de un pobre amortiguamiento del calcio intracelular. En otras palabras, el tratamiento con el NGF también incrementa la liberación inducida por cafeína, favoreciendo con esto una posible contribución de la liberación de calcio intracelular a la amplitud del transitorio de calcio inducido por potasio. Esta posibilidad no puede ser afirmada contundentemente con los datos del presente estudio aunque en trabajos previos en nuestro laboratorio se demostró que la liberación de calcio inducida por calcio (LCIC) contribuye modestamente a los transitorios de calcio inducidos por potasio en las neuronas simpáticas de rata (Hernández-Cruz, 1990; 1997). Por ejemplo, durante el proceso de maduración de las células granulares del cerebro también se encontró que tienden a presentar un incremento similar en los transitorios de calcio inducidos por despolarización (Ciardo, 1991; Mhyre, 2000).

La tasa de remoción del calcio intracelular en células cromafines aumenta rápidamente después de un día de cultivo en presencia del NGF. Este retraso es significativamente más corto que la longitud del tiempo requerido para el desarrollo de otros cambios reportados aquí, permitiendo la posibilidad de que la percepción de este tipo de cambios en la remoción de calcio no involucran la transcripción de genes. Sin embargo, existen numerosos reportes en donde los efectos después del tratamiento con el NGF aparecen después de latencias que están dentro del orden de minutos o unas pocas horas. Estos incluyen cambios en la morfología celular (Connolly, 1981), elongación de las neuritas y movimientos del cono de crecimiento (Seeley, 1983), en la entrada de calcio y movilización de calcio de los reservorios intracelulares (Jiang, 1999), regulación de las bombas Na^+/K^+ (Boonstra, 1982), en los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Pitchford, 1995), y en canales de calcio voltaje dependientes (Jia, 1999), así como cambios en la síntesis de aproximadamente 20 proteínas (Hondermarck, 1994). Estos

cambios rápidos marcan un límite inferior para el tiempo necesario para que el receptor del NGF genere las señales requeridas para estimular la transcripción de genes.

Alteraciones en la cinética y en la amplitud de transitorios de calcio inducidos por cafeína en células cromafines después del tratamiento con el NGF. Una característica de la diferenciación neuronal.

La presencia de los receptores de rianodina y reservorios intracelulares de calcio sensibles a cafeína en neuronas ha sido ampliamente aceptada, aunque su papel funcional permanece poco claro (Kostyuk, 1994; Kuba, 1994; Verkhatsky, 1996; Usachev, 1999). Debido a que la cafeína es un activador muy efectivo de la liberación de calcio a través de los receptores de rianodina tanto en células cromafines como en las neuronas simpáticas, decidimos explorar los cambios en la respuesta a la cafeína resultantes del tratamiento con el NGF en las células cromafines. El objetivo de estos experimentos fue determinar si la adquisición del fenotipo neuronal está asociado con una reorganización funcional de los reservorios intracelulares de calcio. Como se demostró, la liberación de calcio de los reservorios intracelulares de calcio fue, en promedio, 14 veces más grande y se desarrolló 21 veces más rápido en las células tratadas con el NGF que en las células cromafines carentes del NGF. Esto sugiere que el contenido de calcio liberable en los reservorios o la densidad de receptores a rianodina, o ambos, se incrementan después de la exposición al NGF. Las propiedades de los receptores a rianodina también se pueden ver afectadas. La respuesta a cafeína de las células cromafines tratadas con el NGF no sólo incrementaron en tamaño, sino que estas células también mostraron un pico en forma de transitorio seguido de una liberación lenta y sostenida. En las neuronas simpáticas, el componente de liberación transitoria involucra un proceso regenerativo del tipo todo o nada, sostenido por la LCIC (Hernández-Cruz, 1997). La aparición de un componente de liberación transitoria muy prominente en las células cromafines es por lo tanto el más relevante hallazgo del presente estudio. En el contexto del presente trabajo, esta condición parece ser una característica muy relevante de las presentadas por las neuronas simpáticas.

De los distintos elementos que pueden determinar el cambio en el tamaño de las respuestas a cafeína, nosotros sólo estudiamos el patrón de expresión de los

receptores a rianodina por técnicas de inmunohistoquímica, la cual esta relacionada con la densidad de expresión de los receptores a rianodina. En el grupo de las células tratadas con el NGF los niveles de inmunomarcaje de los receptores a rianodina tipo 2 (pero no los del tipo 1 o 3), incrementaron concomitantemente con el tamaño de la respuesta de calcio a la cafeína, sugiriendo una estrecha relación entre la expresión de la isoforma del receptor a rianodina cardiaco y la liberación de calcio tipo "neuronal". Sin embargo, debe de notarse que la inmunofluorescencia del RYR2 también incrementa transitoriamente al día 5 en el grupo control, sin un incremento paralelo en la respuesta a cafeína. El significado de este incremento transitorio en la inmunofluorescencia del RYR2 es difícil de interpretar sin información adicional.

Los cambios en la inmunoreactividad del RYR2 y la respuesta a cafeína en células cromafines tratadas con el NGF no fueron linealmente correlacionados, particularmente a los últimos días en cultivo. Inicialmente la inmunoreactividad de RYR2 incrementó, mientras que la respuesta a cafeína permanece muy disminuida o incluso decreció. Entonces, en el breve lapso de tiempo entre el día 10 y el día 15 la inmunoreactividad del RYR2 incrementa en un 63%, mientras que la amplitud y la velocidad máxima de la derivada de la respuesta a cafeína aumento entre un 430 y 600 % respectivamente. Nosotros especulamos que esta conducta puede resultar de la naturaleza regenerativa de la LCIC. Con esto, nuestros resultados son consistentes con la noción de que la diferenciación neuronal involucra tanto un incremento en la síntesis del RYR2 y en un mejoramiento entre el acople funcional de estos resultando en la LCIC con una ganancia de retroalimentación. Indudablemente esta posibilidad nos reserva la posibilidad de realizar experimentos posteriores.

Significancia de las deflexiones inducidas por la cafeína en la línea basal de calcio.

Mas allá de la estimulación que libera calcio, la cafeína promueve el recambio de calcio, tanto por la depleción indirecta de los reservorios (Cseresnyés, 1997), o bien por la estimulación las ATPasas de calcio del retículo endoplásmico (Orkand, 1995). Este aumento del recambio de la cantidad de calcio es sobresaliente visto inmediatamente después del término de la aplicación de cafeína (Friel, 1992b; Nohmi, 1992; Orkand,

1995). De acuerdo con esta idea, la magnitud y la cinética de los transitorios de calcio inducidos por la cafeína están determinadas por la contribución de dos procesos opuestos de la movilización del calcio.

Las células cromafines expuestas al NGF por más de 10 días mostraron un gran incremento en la movilización de calcio inducida por cafeína. Sin embargo, después de 5 días en la presencia del NGF, la amplitud de los transitorios de calcio disminuyeron cuando se comparan con las células con un día de cultivo con el NGF. De manera similar, el área bajo el transitorio también disminuyó después de 5 y 10 días en cultivo con el NGF. El número de células que mostraron esta respuesta de disminución, por efecto de la cafeína, es mas grande en el grupo control después de 1 y 5 días, mientras que el NGF redujo la frecuencia de este tipo de respuestas. Una posible explicación para estas observaciones es que las acciones de la cafeína sobre la movilización del calcio intracelular evolucionan de manera diferencial *in vitro* bajo las distintas condiciones experimentales. Así, la conducta bifásica mostrada por las células cromafines tratadas con el NGF pueden resultar de una transición funcional, mientras que el recambio estimulado por la cafeína se mantiene prevalente a tiempos tempranos de la diferenciación neuronal, y la liberación de calcio inducida por cafeína llega a ser el mecanismo dominante en tiempos mas prolongados. Tratar de entender la naturaleza del proceso que involucra la contribución relativa de estos mecanismos opuestos requiere futuras investigaciones.

El rápido decaimiento de la $[Ca^{2+}]_i$ se observó inmediatamente después de la liberación de calcio inducida por cafeína en neuronas simpáticas de anfibio como resultado de la activación de un mecanismo rápido de recambio denominado transporte de calcio activado por la liberación de calcio (RACT; Cseresnyés, 1997). Con esto se podría argumentar que con un incremento en las proteínas responsables del RACT se pueden explicar las respuestas de disminución del calcio producida por la cafeína observada en las células cromafines entre los días 5 y 10 en cultivo. Mas allá del hecho de que no se ha demostrado la presencia de las RACT en células cromafines, nosotros creemos que esta posibilidad es improbable, principalmente por dos razones. Primero, la activación de las RACT requiere de un incremento local de la $[Ca^{2+}]_i$ muy cerca del retículo endoplásmico (Cseresnyés, 1997). Sin embargo, ninguna o muy poca liberación de calcio precede a todas las disminuciones de calcio después de la aplicación de la

cafeína. Segundo, las RACT disminuyen significativamente durante largas aplicaciones de cafeína, presumiblemente por que presenta una alteración en el mecanismo de transporte (Cseresnyés, 1997). Sin embargo, el decremento en la $[Ca^{2+}]_i$ por debajo de la línea basal en las células cromafines ocurre durante la aplicación de la cafeína, cuando las RACT deben de estar inhibidas. Una reducción del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ fue a menudo observada después de que termina la aplicación de la cafeína, apoyando la idea de que los incrementos del recambio de la $[Ca^{2+}]_i$ se desarrollan durante la aplicación de la cafeína, no después.

¿La diferenciación neuronal sólo involucra un mejor desempeño de funciones que ya están presentes en las células cromafines?

La diferenciación neuronal inducida por el NGF en las células cromafines involucra un incremento de la función de los CCVD, de los canales que liberan calcio y de los mecanismos de remoción de calcio. Todas estas funciones están presentes, al menos de una manera rudimentaria, en las células cromafines postnatales. Una pregunta que puede surgir es si la diferenciación involucra la aparición de nuevas propiedades, o si simplemente consiste en el aumento de las funciones preexistentes. En el caso del influjo de calcio por los canales operados por voltaje o la remoción de calcio, la respuesta probablemente puede ser que su participación simplemente llega a ser más conspicua. Sin embargo, en el caso de la movilización de calcio inducida por cafeína, se puede argumentar que diferentes propiedades de tipo cualitativo aumentan llegando a ser que esta contribución se incrementa inmoderadamente.

La interacción entre los RyRs vecinos es de suma importancia en los modelos de LCIC, indicando que estos están lo suficientemente cercanos uno a otros de tal manera que responden de manera global y general a la liberación de calcio. Por lo tanto, se ha propuesto en modelos teóricos que las interacciones mediadas por calcio entre los RyR vecinos llega a ser altamente cooperativa cuando su densidad sobrepasa un nivel crítico (Stern, 1992). El surgimiento de este fenómeno de liberación de calcio regenerativo en células cromafines sugiere el desarrollo de interacciones más significativas entre canales de liberación vecinos. El desarrollo de esta nueva característica tiene profundas implicaciones en su habilidad de amplificar los estímulos

mediados por las señales intracelulares de calcio. Estudios adicionales son necesarios para probar esta hipótesis, pero si nuestro intento de interpretación es correcto, es posible tomar una ventaja de este modelo de diferenciación *in vitro* para examinar directamente los posibles cambios en la microarquitectura de los reservorios de calcio asociados con el apoyo de la LCIC en gran escala.

La hipótesis principal que enmarco al presente estudio es que los cambios en la homeostasis y dinámica de calcio en las células cromafines diferenciadas recapitulan los cambios que ocurren durante la maduración de las neuronas simpáticas *in vivo*. De esta manera, uno puede especular que el incremento tardío de la LCIC mediado por el incremento en la expresión de los RYR2 puede ser crucial en la diferenciación de las neuronas ya que les permite responder a las señales medioambientales, así como para generar señales localizadas de calcio. La LCIC también puede permitir que se originen señales desde una región celular pequeña y que se propaguen a una región mucho más grande en el citosol. Por ejemplo, en neuronas espinales de anfibio y en neuronas de la raíz del ganglio dorsal, la LCIC participa direccionando la señal de los transitorios de calcio hacia el núcleo (Holliday, 1991; Spitzer, 1994; Utzschneider, 1994).

En neuronas simpáticas postnatales, la CICR parece estar asignada a favorecer la amplificación de las señales de calcio originadas de los reservorios intracelulares como son los reservorios sensibles a IP3 y RYR, implementando así una señal que intensifica los gradientes generados por la liberación de calcio inducida por un agonista. Es concebible que el desarrollo del RyR tipo cardíaco pueda llevar a cabo funciones similares en células cromafines tratadas con el NGF.

BIBLIOGRAFIA

- Aloe, L. and Levi-Montalcini, R. (1979). Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells *in vivo* into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A. Vol 76(3): 1246-1250.
- Anderson, D.J. (1989). The neural crest cell lineage problem: Neurogenesis? Neuron. Vol 3(1): 1-12.
- Anderson, D.J. (1993). Molecular Control of Cell Fate in the Neural Crest: The Sympathoadrenal Lineage. Ann. Rev. Neurosci. Vol 16: 129-158.
- Anderson, D.J. (1997). Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. TIG. Vol 13(7): 276-280.
- Anderson, D.J. and Axel, R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoides. Cell. Vol 47(6): 1079-1090.
- Aunis, D. (1998). Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. Int Rev Cytol. Vol 181: 213-320.
- Blaustein, M.P. (1988). Calcium transport and buffering in neurons. TiNS. Vol 11(10): 438-443.
- Cochard, P. and Paulin, D. (1984). Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo*. J Neurosci. 4(8): 2080-94.
- Collins, F., Schmidt, M.F., Guthrie, P.B. and Kater, S.B. (1991). Sustained increase in intracellular calcium promotes neuronal survival. J. Neurosci. Vol 11(8): 2582-2587.
- Connor, J.A. (1986). Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single, mammalian central nervous system cells. Proc Natl Acad Sci U S A. Vol 83(16): 6179-6183.
- Crane, J.F. and Trainor, P.A. (2006). Neural Crest Stem and Progenitor Cells. Ann. Rev. Cell Dev. Biol. Vol 22: 267-286.
- D'Andrea, P. and Grohovaz, F. (1995). $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in rat chromaffin cells: frequency and amplitude modulation by Ca^{2+} and $InsP_3$. Cell Calcium. Vol 17(5): 367-374.

- D'Andrea, P. and Thorn, P. (1996). Ca²⁺ signalling in rat chromaffin cells: interplay between Ca²⁺ release from intracellular stores and membrane potential. *Cell Calcium*. Vol 19(2): 113-123.
- Distasi, C., Torre, M., Antoniotti, S., Munaron, L. and Lovisolo, D. (1998). Neuronal survival and calcium influx induced by basic fibroblast growth factor in chick ciliary ganglion neurons. *Eur J Neurosci*. Vol 10(7): 2276-2286.
- Doupe, A.J., Landis, S.S. and Patterson, P.H. (1985). Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci*. Vol 5: 2119-2142.
- Dowd, D.R. (1995). Calcium regulation of apoptosis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. Vol 30: 255-280.
- Drucker-Colín, R., Verdugo-Díaz, L., Méndez, M., Carrillo-Ruiz, J., Morgado-Valle, C., Hernández-Cruz, A. and Corkidi, G. (1994). Comparison between Low Frequency Magnetic Field Stimulation and Nerve Growth Factor Treatment of Cultured Chromaffin Cells, on Neurite Growth, Noradrenaline Release, Excitable Properties, and Grafting in Nigrostriatal Lesioned Rats. *Mol Cell Neurosci*. Vol 5(6): 485-498.
- Ernsberger, U., Patzke, H., Tissier-Seta, J.P., Reh, T., Golidis, C. and Rohrer, H. (1995). The expression of tyrosine hydroxylase and the transcription factors cPhox-2 and Cash-I: evidence for distinct inductive steps in the differentiation of chick sympathetic precursor cells. *Mech Devel*. Vol 52: 125-136.
- Finkbeiner, S. and Greenberg, M.E. (1996). Ca²⁺-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity? *Neuron*. Vol 16(2): 233-236.
- Franklin, J.L. and Johnson, E.M.Jr. (1994). Elevated intracellular calcium blocks programmed neuronal death. *Ann N Y Acad Sci*. Vol 747: 195-204.
- Furuichi, T., Furutama, D., Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. and Mikoshiba, K. (1994). Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci*. Vol 14(8): 4794-4805.
- Gandía, L., Borges, R., Albillos, A. and García, A.G. (1995). Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch*. Vol 430(1): 55-63.

- Giannini, G. and Sorrentino, V. (1995). Molecular structure and tissue distribution of ryanodine receptors calcium channels. *Med Res Rev.* Vol 15(4): 313-23.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* Vol 260(6): 3440-3450.
- Gu, X. and Spitzer, N.C. (1997). Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev Neurosci.* Vol 19(1): 33-41.
- Hernández-Cruz, A., Escobar, A.L. and Jiménez, N. (1997). Ca²⁺-induced Ca²⁺ release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca²⁺. *J Gen Physiol.* Vol 109(2): 147-67.
- Hirsch, M.R., Tiveron, M.C., Guillemot, F., Brunet, J.F. and Golidis, C. (1998). Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. *Development* . Vol 125: 599-608.
- Huber, K. (2006). The sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives. *Dev. Biol.* Vol 298(2): 335-343.
- Huber, K., Brühl, B., Guillemot, F., Olson, E.N., Ernsberger, U. and Unsicker, K. (2002). Development of chromaffin cells depends on MASH1 function. *Development* Vol 129: 4729-4738.
- Islas-Suárez, L., Gómez-Chavarín, M., Drucker-Colín, R. and Hernández-Cruz, A. (1994). Properties of the sodium current in rat chromaffin cells exposed to nerve growth factor *in vitro*. *J. Neurophysiol.* Vol 72(4): 1938-1948.
- Johnson, M.I. and Argiro, V. (1983). Techniques in the tissue culture of rat sympathetic neurons. *Methods Enzymol.* Vol 103: 334-347.
- Keller, J.N., Guo, Q., Holtsberg, F.W., Bruce-Keller, A.J. and Mattson, M.P. (1998). Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. *J Neurosci.* Vol 18(12): 4439-4450.
- Knecht, A.K. and Bronner-Fraser, M. (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet.* Vol 3(6): 453-61.

- Komuro, H. and Rakic, P. (1992). Selective role of N-type calcium channels in neuronal migration. *Science*. Vol 257(5071): 806-809.
- Komuro, H. and Rakic, P. (1996). Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*. Vol 17(2): 275-285.
- Kostyuk, P. and Verkhratsky, A. (1994). Calcium stores in neurons and glia. *Neurosci* Vol 63(2): 381-404.
- Kostyuk, P. and Verkhratsky, A. (1994). Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*. Vol 63(2): 381-404.
- Lampe, P.A., Cornbrooks, E.B., Juhasz, A., Johnson, E.M.Jr. and Franklin, J.L. (1995). Suppression of programmed neuronal death by a thapsigargin-induced Ca²⁺ influx. *J Neurobiol*. Vol 26(2): 205-212.
- Langley, K. and Grant, N.J. (1999). Molecular markers of sympathoadrenal cells. *Cell Tissue Res*. Vol 298: 185–206.
- Larmet, Y., Dolphin, A.C. and Davies, A.M. (1992). Intracellular calcium regulates the survival of early sensory neurons before they become dependent on neurotrophic factors. *Neuron*. Vol 9(3): 563-574.
- Le Douarin, N.M.; Brito, J.M. and Creuzet, S. (2007). Role of the neural crest in face and brain development. *Brain Res. Rev*. Vol 55(2): 237-247.
- Lillien, L.E. and Claude, P. (1985). Nerve growth factor is a mitogen for cultured chromaffin cells. *Nature*. Vol 317(6038): 632-634.
- Liu, P.S., Lin, Y.J. and Kao, L.S. (1991). Caffeine-sensitive calcium stores in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*. Vol 56(1): 172-177.
- Livett, B.G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells *in vitro*. *Physiol. Rev*. Vol 64(4): 1103-1161.
- Lomax, R.B., Michelena, P., Núñez, L., García-Sancho, J., García, A.G, and Montiel, C. (1997). Different contributions of L- and Q-type Ca²⁺ channels to Ca²⁺ signals and secretion in chromaffin cell subtypes. *Am J Physiol*. Vol 272(2 Pt 1): C476-C484.
- Loring, J.F. and Erickson, C.A. (1987). Neural Crest Cell Migratory Pathways in the Trunk of the Chick Embryo. *Dev. Biol*. Vol 121: 220-236.
- Lumsden, A. (1989). Multipotent cells in the avian neural crest. *TiNS*. Vol 12(3): 81-83.

- Malgaroli, A. and Meldolesi, J. (1991). $[Ca^{2+}]_i$ oscillations from internal stores sustain exocytic secretion from the chromaffin cells of the rat. *FEBS Lett.* Vol 283(2): 169-172.
- Morgado-Valle, C., Verdugo-Díaz, L., García, D.E., Morales-Orozco, C. and Drucker-Colín, R. (1998). The role of voltage-gated Ca^{2+} channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res.* Vol 291(2): 217-30.
- Morimoto, M., Morita, N. and Kawata, M. (1994). The effects of NGF and glucocorticoid on the cytological features of rat chromaffin cells *in vitro*. *Neuroreport.* Vol 5(8): 954-956.
- Muller, T.H. and Unsicker, K. (1986). Nerve growth factor and dexamethasone modulate synthesis and storage of catecholamines in cultured rat adrenal medullary cells: dependence on postnatal age. *J. Neurochem.* Vol 46(2): 516-524.
- Pandiella-Alonso, A., Malgaroli, A., Vicentini, L.M. and Meldolesi, J. (1986). Early rise of cytosolic Ca^{2+} induced by NGF in PC12 and chromaffin cells. *FEBS Lett.* Vol 208(1): 48-51.
- Park, Y.B., Herrington, J., Babcock, D.F. and Hille, B. (1996). Ca^{2+} clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol.* Vol 492 (Pt 2): 329-346.
- Patterson, P.H. (1990). Control of cell fate in a vertebrate neurogenic lineage. *Cell.* Vol 62(6): 1035-1038.
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. and Brunet, J.F. (1999). The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature.* VOL 399: 366-370.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. and Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.* Vol 74(3): 595-636.
- Raible, D.W. and Ungos, J.M. (2006). Specification of sensory neuron cell fate from the neural crest. In: *Neural Crest Induction and Differentiation*. Ed. by Saint-Jeannet, J.P. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol 589. USA. Pag: 170-180.
- Schubert, P., Ogata, T., Marchini, C., Ferroni, S. and Rudolphi, K. (1997). Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. *Ann N Y Acad Sci.* Vol 825: 1-10.

- Song, L.S., Sham, J.S., Stern, M.D., Lakatta, E.G. and Cheng, H. (1998). Direct measurement of SR release flux by tracking 'Ca²⁺ spikes' in rat cardiac myocytes. *J Physiol*. Vol 512 (Pt 3): 677-691.
- Stanke, M., Stubbusch, J. and Rohrer, H. (2004). Interaction of Mash1 and Phox2b in sympathetic neuron development. *Mol. Cell. Neurosci*. 25: 374-382.
- Sui, A.L. and Kao, L.S. (1994). Depletion and refilling of intracellular calcium pools in bovine chromaffin cells. *Neurochem Res*. Vol 19(6): 753-759.
- Tischler, A.S., Riseberg, J.C., Hardenbrook, M.A. and Cherington, V. (1993). Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult rat chromaffin cells *in vitro*. *J. Neurosci*. Vol 13: 1533-1542.
- Toshio, O., Shigeo, I., Manami, K. and Yoshikazu, N. (1998). Involvement of voltage-dependent Ca²⁺ channels in cytosolic Ca²⁺ increase induced by deprivation of extracellular cations in adrenal chromaffin cells of the guinea pig. *Brain Res*. Vol 814(1-2): 99-111.
- Trump, B.F. and Berezesky, I.K. (1992). The role of cytosolic Ca²⁺ in cell injury, necrosis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. Vol 4(2): 227-232.
- Tsien, R.Y. and Harootunian, A.T. (1990). Practical design criteria for a dynamic ratio imaging system. *Cell Calcium*. Vol 11(2-3): 93-109.
- Ungar, A. and Phillips, J.H. (1983). Regulation of the adrenal medulla. *Physiol Rev*. Vol 63(3): 787-843.
- Unsicker, K., Krish, B., Otten and Thoenen, H. (1978). Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol 75(7): 3498-3502.
- Unsicker, K., Seidl, K. and Hofmann, H.D. (1989). The neuro-endocrine ambiguity of sympathoadrenal cells. *Int J Dev Neurosci*. Vol 7(5): 413-417.
- Vaglia, J.L. and Hall, B.K. (1999). Regulation of neural crest cell populations: occurrence, distribution and underlying mechanisms. *Int. J. Dev. Biol*. Vol 43: 95-110.
- Wakade, A.R., Wakade, T.D., Poosch, M. and Bannon, M.J. (1996). Noradrenaline transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells are

controlled by dexamethasone and nerve growth factor. *J. Physiol.* Vol 494(Pt1): 67-75.

ANEXO I – ARTÍCULO

Modifications of intracellular Ca²⁺ signalling during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of rat adrenal chromaffin cells.

Nicolás Jiménez and Arturo Hernández-Cruz.

European Journal of Neuroscience. 2001, Vol. 13, pp. 1487 – 1500.

Modifications of intracellular Ca^{2+} signalling during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of rat adrenal chromaffin cells

Nicolás Jiménez and Arturo Hernández-Cruz

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Biofísica, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México City, D.F. 04510, México

Keywords: chromaffin cells, nerve growth factor, ryanodine receptor, Ca^{2+} -release channel, Ca^{2+} signalling

Abstract

Postnatal sympathetic neurons (SNs) and chromaffin cells (CCs) derive from neural crest precursors. CCs can differentiate *in vitro* into SN-like cells after nerve growth factor (NGF) exposure. This study examines changes of intracellular Ca^{2+} homeostasis and dynamics of CCs under conditions that promote a neuronal phenotype. Spontaneous Ca^{2+} fluctuations, a frequent observation in early cultures of CCs, diminished after > 10 days *in vitro* in control cells and ceased in NGF-treated ones. At the same time, Ca^{2+} rises resulting from entry upon membrane depolarization, gradually increased both their size and peak $d[\text{Ca}^{2+}]/dt$, resembling those recorded in SNs. Concomitantly, caffeine-induced Ca^{2+} rises, resulting from Ca^{2+} release from intracellular stores, increased their size and their peak $d[\text{Ca}^{2+}]/dt$ by > 1000%, and developed transient and sustained release components, similar to those of SNs. The transient component, linked to regenerative Ca^{2+} release, appeared after > 10 days of NGF treatment, suggesting a delayed steep enhancement of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR). Immunostaining showed that proteins coded by the three known isoforms of ryanodine receptors (RyRs) are present in CCs, but that only RyR₂ increased significantly after NGF treatment. Since the transient release component increased more steeply than RyR₂ immunostaining, we suggest that the development of robust CICR requires both an increased expression of RyRs and more efficient functional coupling among them. NGF-induced transdifferentiation of chromaffin cells involves the enhancement of both voltage-gated Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores. These modifications are likely to complement the extensive morphological and functional reorganization required for the replacement of the endocrine phenotype with the neuronal one.

Introduction

Adrenal chromaffin cells (CCs) and sympathetic neurons (SNs) derive from committed neural crest sympathoadrenal precursors (Patterson, 1990). During development, the exposure of these precursors to fibroblast growth factor and nerve growth factor (NGF) induces a neuronal phenotype whereas the presence of glucocorticoids in the adrenal gland inhibits neuronal differentiation and induces the chromaffin phenotype (Doupe *et al.*, 1985; reviewed by Anderson, 1993). CCs, even those derived from adult animals, retain the capability to divide *in vitro*, and adopt a neuronal phenotype upon exposure to NGF and other growth factors (Tischler *et al.*, 1993). Differentiation into SN-like cells includes a variety of morphological, physiological and biochemical changes (Unsicker *et al.*, 1978; Doupe *et al.*, 1985; Tischler *et al.*, 1993; Islas-Suárez *et al.*, 1994). It is important to fully understand the extent of alterations induced by NGF, as they could be relevant to neuronal differentiation of the sympathoadrenal lineage *in vivo*.

CCs have been used as a model for understanding the relationship between intracellular Ca^{2+} levels and secretion. Thus, their intracellular Ca^{2+} homeostasis and dynamics have been extensively examined (O'Sullivan *et al.*, 1989; Neher & Augustine, 1992; Park *et al.*, 1996). To some extent, these aspects have also been studied in

the soma of postnatal SNs (Thayer *et al.*, 1988; Hernández-Cruz *et al.*, 1990, 1995, 1997; Friel & Tsien, 1992a, b; Nohmi *et al.*, 1992b). Significant differences between these phenotypes have been documented, although a direct comparison under the same experimental conditions has not been conducted. Also, changes in voltage-gated Ca^{2+} influx during neuronal differentiation of CCs and pheochromocytoma-derived PC12 cells have been reported (Morgado-Valle *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 1999), but the effects on Ca^{2+} homeostasis and dynamics have not been examined. The hypothesis for this work is that CCs must undergo substantial adaptations in their Ca^{2+} handling mechanisms, from a pattern suitable to the endocrine function, to one more appropriate for the neuronal phenotype.

Here, we examined the effects of NGF on Ca^{2+} homeostasis and dynamics of CCs during the progression to a neuronal phenotype. These include Ca^{2+} mobilization induced by intracellular Ca^{2+} release and voltage-gated Ca^{2+} influx. We also examined the immunoreactivity of the three subtypes of ryanodine receptors (RyRs). NGF-induced differentiation of CCs into SN-like cells involves an enhanced participation of voltage-gated Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores, as well as an increased immunostaining of the cardiac isoform of the ryanodine receptor (RyR₂). These changes in Ca^{2+} signalling concur with a variety of functional and anatomical adaptations known to occur during neuronal differentiation *in vivo*. Some of these results have been presented in abstract form (Jiménez & Hernández-Cruz, 1998).

Correspondence: Dr Arturo Hernández-Cruz, as above.
E-mail: ahernan@ifcsun1.ifisiol.unam.mx

Received 29 June 2000, revised 1 February 2001, accepted 12 February 2001

Materials and methods

Tissue culture of chromaffin cells

Adrenal tissue was obtained from 10-day-old rats, according to methods described by Islas-Suárez *et al.* (1994). Adrenal glands from 15 rats per experiment were excised after ether anaesthesia and cervical dislocation. Medullae were incubated in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Hanks (pH = 7.4, Gibco, Life Technologies, Rockville, MD, USA) with 2 mg/mL collagenase type 1 (Worthington Biochem. Corp., Lakewood, NJ, US) and 2 mg/mL DNase type 1 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) for 30 min at 37 °C. After incubation, tissue fragments were triturated with a fire-polished siliconized Pasteur pipette. The cell suspension was centrifuged and the pellet was washed twice and resuspended in fresh Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 2 mM L-glutamine (Sigma), 4.5 mg/mL insulin (Sigma) and penicillin-streptomycin (Gibco; control culture medium). Cells were plated in 12-well cell culture plates (1×10^6 cells per well; Costar Corning, New York, NY, USA) on poly L-lysine-treated (Sigma) number 1 round glass coverslips (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA), and maintained for up to 2 weeks either in control medium, or in medium supplemented with 100 ng/mL of 7S NGF (Alomone Labs, Jerusalem, Israel), at 37 °C in a humidified atmosphere (95% air and 5% CO_2). Culture medium was changed three times per week.

Tissue culture of rat sympathetic neurons

Cultures of superior cervical ganglion neurons were prepared as in Hernández-Cruz *et al.* (1997). Briefly, ganglia from 10-day-old rats were removed under aseptic conditions after ether anaesthesia and cervical dislocation. After cleaning and chopping, they were incubated in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Hanks with 1 mg/mL trypsin (Worthington) and 2 mg/mL DNase I for 30 min at 37 °C. After digestion, trypsin was inactivated by dilution in DMEM containing 10% FBS and 1 mg/mL trypsin inhibitor (Sigma), and the tissue was incubated in Hanks with 2 mg/mL collagenase and 2 mg/mL DNase I for 30 min at 37 °C. After trituration with a Pasteur pipette, the cell suspension was centrifuged, washed twice in Hanks and resuspended in fresh control culture medium. Cells were seeded on poly L-lysine-treated number 1 round glass coverslips (1×10^5 cells per well), and maintained in control culture medium supplemented with 20–50 ng/mL of 7S NGF at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO_2 . Culture medium was changed three times per week. Most experiments were carried out with cultures less than 5 days old.

Culture of Chinese hamster ovary cells

Chinese hamster ovary (CHO) cells (CHO-K1, Chinese Hamster Ovary; American Type Culture Collection number ATCC CCL61 from *Crisetulus griseus*, a gift from Dr Bernardo Rudy), were cultured in α -MEM (Gibco) supplemented with 10% of FBS in the presence of penicillin and streptomycin at 37 °C in a 95% O_2 with 5% of CO_2 atmosphere in 100-mm diameter culture dishes (Costar). When the cells were confluent, the monolayer was detached with trypsin-EDTA (Gibco) for 1 min and the cells resuspended in α -MEM containing 10% of FBS and plated at a 1 : 10 dilution in new 100 mm dishes or in number 1 glass coverslips. The medium was changed every 2 days and the cells passed every 4 days.

Measurements of intracellular Ca^{2+} concentrations

Methods are described in detail elsewhere (Hernández-Cruz *et al.*, 1997). Briefly, a coverslip containing either CCs or SNs was transferred to a recording chamber (Mod. RC-25, Warner

Instruments, Hamden, CT, USA) placed on an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corp., Tokyo, Japan). Cells were loaded with fura-2 by incubation for 30–45 min at room temperature with 2 μM fura-2 AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), with no dispersing agents added. Cells were then rinsed with dye-free recording solution for 15 min before the beginning of the experiments.

Ca^{2+} levels were determined by recording with an UV objective (Nikon UV-F 100 \times , 1.3 NA) and an intensified CCD camera (c2400–87, Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA), pairs of images using alternating illumination by two nitrogen-pulsed lasers (Laser Science Inc., Franklin, MA, USA), tuned at 340 nm and 380 nm excitation, respectively. The sampling rate (340 : 380 ratio) was 2.5 Hz. Background images taken at 340 and 380 nm illumination were used for online background subtraction. Image acquisition and processing was controlled with BioLase's FL-2 software (BioLase Imaging, Newton, MA, USA). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ determinations from the soma of individual cells were calculated using the formula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D (F_f/F_b)(R - R_{\min})/(R_{\max} - R)$$

where the dissociation constant (K_D) of fura-2 for Ca^{2+} is 300 nM, F_f/F_b is the ratio of fluorescence values for Ca^{2+} -free/ Ca^{2+} -bound indicator at 380 nm excitation, R is the fluorescence ratio at 340/380 nm for the unknown $[\text{Ca}^{2+}]_i$, and R_{\min} and R_{\max} are the ratios of fura-2 fluorescence at 340/380 nm of Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -bound fura-2, respectively. The values of F_f/F_b , R_{\min} and R_{\max} for Ca^{2+} were empirically determined using calibration solutions containing 50 μM fura-2 pentapotassium salt (Molecular Probes), and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the range 0–40 μM . Baseline $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was defined as the time-averaged $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measured in the absence of stimulation over a period of 5 min. The variance over the mean (VOM) of baseline $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was also determined from these data. The peak amplitude of the Ca^{2+} transients was measured as the difference between the absolute peak $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the resting baseline $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ca^{2+} transients were further analysed by digitally computing the first derivative of the Ca^{2+} records ($d[\text{Ca}^{2+}]_i/dt$). The peak value was measured during the upstroke of the Ca^{2+} transient. The area under the curve (integral) of the Ca^{2+} transient was also digitally computed. Data processing was accomplished with routines contained in Origin 3.78 (Microcal software, Northampton, MA, USA).

Solutions

Cells were continuously superfused (≈ 1 mL/min) with a recording solution containing (in mM) NaCl 130, KCl 3, CaCl_2 2, MgCl_2 2, NaHCO_3 1, NaH_2PO_4 0.5, HEPES-Na 5, and glucose 5 (pH = 7.4 with NaOH). Test solutions were pressure-applied (10 p.s.i.) via independent glass puffer pipettes (tip diameter ≈ 2 μm) placed within 100 μm from the cell(s) under examination. Application of test solutions and drugs was controlled by two Picospritzer II devices (General Valve, Fairfield, NJ, USA) governed by an 486/AT computer running pClamp 5.1 (Axon Instruments, Foster city, CA, USA). Test solutions used were: (i) a depolarizing solution containing 140 mM KCl, 10 mM HEPES-Na and 10 mM CaCl_2 (pH = 7.4), and (ii) 10-mM caffeine dissolved in normal saline. A protocol was designed to examine the contributions of voltage-gated Ca^{2+} influx and Ca^{2+} release from intracellular stores; following a 5-min baseline recording, the cells were stimulated by three puffer applications of depolarizing high K^+ solution (10 p.s.i.; 400 ms, 30 s intervals). Then, a new baseline recording of 2 min was obtained, and caffeine 10 mM pulse was applied with the second puffer pipette (10 p.s.i.; 30 s). The rationale for this protocol was to ensure that Ca^{2+} stores were completely full when caffeine was applied. As shown

previously in SNs (Hernández-Cruz *et al.*, 1997), both the magnitude and peak rate of raise of caffeine-induced Ca²⁺ release reach saturation after three to four conditioning depolarizing pulses. Experiments were carried out at 22–23 °C.

Immunocytochemistry

Antibodies

Primary antibodies used were: antiskeletal muscle ryanodine receptor (anti-RyR₁); sheep polyclonal IgG; antibrain ryanodine receptor (anti-RyR₃); goat polyclonal IgG (both from Upstate Biotechnology Inc., New York, NY, USA), and anticardiac ryanodine receptor (anti-RyR₂; mouse monoclonal antibody; a gift from Drs Myrna Dent and Anthony Lai). Secondary antibodies used were: for anti-RyR₁, FITC-labelled rabbit antishoop whole IgG (H + L chain) (Zymed, San Francisco, CA, USA); for anti-RyR₂, FITC-labelled goat antimouse IgG (H + L) (Sigma ImmunoChemicals) and for anti-RyR₃, FITC-labelled rabbit antigoat IgG (H + L) (Zymed).

Immunostaining

Cultures were grown under the specified conditions and then fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) for 30 min and washed three times with phosphate-buffered saline (PBS). Then, they were incubated with a PBS blocking solution containing 10% (w/v) dried (fat-free) cow's milk and 0.1% (v/v) Triton X100 (Sigma) for 1 h at room temperature. Then, cultures were washed three times, and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody (1 : 1000 in PBS). Cultures were then washed and incubated with the FITC-conjugated secondary antibody (1 : 100 in PBS) for 2 h. After final washing, cultures were mounted with medium containing 15 mM of NaN₃ (Dako, Carpinteria, CA, USA).

Image acquisition and analysis

Samples were viewed with a 60× oil immersion objective, NA 1.4 (Plan Apo 60, Nikon), using epifluorescence illumination with a 100-W mercury lamp mounted on a Diaphot TMD microscope (Nikon). Images (16-bit resolution) were acquired with a cooled CCD digital camera (MCD1000; SpectraSource Instruments, Westlake Village, CA, USA). Illumination was limited to the exposure time with an electronic shutter (Lambda 10, Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Images (300 by 300 pixels; 0.25 s exposure) were converted to TIFF image format (8 bits) and analysed with Image-Pro Plus software 2.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). A small circle (14 pixels/1.6 μm in diameter) was defined as the area of interest from which mean brightness was determined from different regions of the image. Fluorescence intensity measurements were taken from a cytoplasmic (non-nuclear) region of each CC in the image, as well as from three to eight areas of the coverslip free of cells (background values). CCs were easily distinguished from contaminating cells present in primary cultures. The mean background was then subtracted from raw fluorescence intensities measured from individual cells. Background-corrected fluorescence intensity values for at least 100 cells from each experimental group were processed with a statistical program (see Statistics) and the results were plotted with Origin 3.8 (Microcal Software). Every experiment was repeated at least twice, and data from the same experimental condition in different cultures were pooled.

Statistics

Data analysis was performed using Statview 4.57 statistical program (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA), with comparisons using two-way analyses of variance (ANOVA). Significant differences are

reported based upon the Fisher's *post hoc* least significant difference (PLSD) test. All the data are reported as a mean ± SEM. for a given measurement.

Results

Effects of NGF on baseline Ca²⁺ levels and spontaneous Ca²⁺ fluctuations

One important aspect of Ca²⁺ homeostasis is resting [Ca²⁺]_i, which is maintained at low levels by the interaction between Ca²⁺ buffering, sequestration and extrusion (Pozzan *et al.*, 1994). In most cells, resting [Ca²⁺]_i is maintained within very narrow limits, but in other ones, it can undergo large fluctuations. As a first approximation to evaluate Ca²⁺ homeostasis, baseline [Ca²⁺]_i was determined in CCs at fixed intervals over a culture period of 15 days. The determination of a 'resting [Ca²⁺]_i', value is simple in quiescent cells, but not in spontaneously active ones. Here, we resolved to measure the 'baseline [Ca²⁺]_i', defined as the time-averaged [Ca²⁺]_i measured in the absence of stimulation for 5 min. The experimental conditions used were control and nerve growth factor-treated (NGF). For comparison, baseline Ca²⁺ levels were also measured from SNs. As previously demonstrated, CCs exposed to NGF undergo significant morphological and functional changes, while control cells largely retain their chromaffin phenotype (Unsicker *et al.*, 1978; Islas-Suárez *et al.*, 1994; Morimoto *et al.*, 1994).

As shown in Fig. 1A, baseline after 1 day in culture [Ca²⁺]_i was similar between the two experimental groups ($P = 0.81$). However, after 5 days, control CCs increased significantly ($P < 0.0001$) their baseline [Ca²⁺]_i, from 62.9 ± 7.5 nM; ($n = 19$) to 454.3 ± 32.6 nM ($n = 26$). NGF-treated CCs did not show this increase in [Ca²⁺]_i ($P = 0.5$). Baseline [Ca²⁺]_i of the group of control CCs diminished subsequently, and after 15 days *in vitro* it became indistinguishable from that of the NGF group, or from that measured after 1 day in culture (see Fig. 1A). Baseline Ca²⁺ levels of the control and NGF groups after 15 days *in vitro* were very similar each to the other ($P = 0.75$), and to those measured in SNs ($P = 0.81$ and 0.92 , respectively; see Table 1).

The time-averaged baseline [Ca²⁺]_i closely reflects resting [Ca²⁺]_i, in quiescent cells, but it is contaminated to some extent by the appearance of spontaneous [Ca²⁺]_i fluctuations in the active ones. Moreover, the frequency of these fluctuations in CCs changed under certain experimental conditions (discussed later). To account for these differences, the same [Ca²⁺]_i data were analysed to determine the VOM (see Materials and methods). These results are summarized in Fig. 1B. Important differences between experimental groups were revealed by this simple analysis. First, at 1 day in culture the VOM values were similarly high both in the control and NGF groups ($P = 0.65$). In contrast, baseline [Ca²⁺]_i levels were much less varying in SNs (see Table 1). Second, after 5 days in culture, spontaneous Ca²⁺ fluctuations in CCs became larger and more frequent in the control group, while they remained unchanged in the NGF group. Accordingly, VOM increased by 160% in the control group ($P = 0.05$). Third, similar to baseline Ca²⁺ levels, the VOM diminished progressively after 10 days in both groups (compare Fig. 1A and B). By 15 days in culture, the VOM of both control and NGF groups was indistinguishable from that measured in SNs ($P = 0.82$ and 0.92 , respectively; see Table 1). To examine these differences more closely, the VOM values were plotted as frequency histograms (Fig. 2A–E). For simplicity, VOM distributions from each experimental group are compared only between 1 (Fig. 2A and B) and 15 days (Fig. 2C and D) *in vitro*. After 1 day in culture, the

distributions in the control and NGF groups were relatively spread and quite similar to one another. However, after 15 days both distributions became narrower and shifted to significantly lower mean values. These changes, which were most noticeable in the NGF group, indicate that baseline $[Ca^{2+}]_i$ progressively became more stable. Example records shown by the corresponding insets of Fig. 2 illustrate these differences. Notice the close similarity of VOM distributions between the NGF-treated group after 15 days (Fig. 2D)

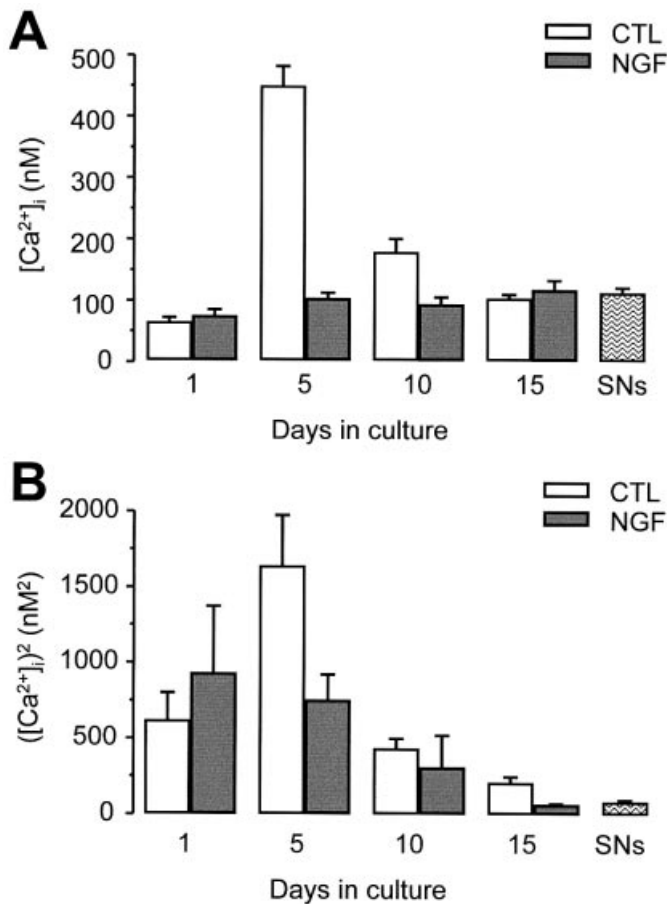


FIG. 1. (A) Baseline intracellular $[Ca^{2+}]_i$ of chromaffin cells grown with or without nerve growth factor (NGF) in the culture medium, examined after 1, 5, 10 and 15 days *in vitro*. (B) Corresponding plot of the variance over the mean (VOM) of baseline $[Ca^{2+}]_i$, used as an index of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations. CTL, control; SNs, sympathetic neurons, shown for comparison.

TABLE 1. Changes in Ca^{2+} homeostasis and dynamics of chromaffin cells grown in the presence or in the absence (control) of NGF, and of sympathetic neurons (SNs) for comparison

	Days <i>in vitro</i>	n	Baseline $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	Variance over mean resting $[Ca^{2+}]_i$ (nM ²)	Peak amplitude K^+-Ca^{2+} transient (nM)	Derivative K^+-Ca^{2+} transient (nM/s)	Time constant of decay K^+-Ca^{2+} transient (s)	Peak amplitude C- Ca^{2+} transient (nM)	Derivative C- Ca^{2+} transient (nM/s)
Control	1	19	62.9 ± 7.5	619.4 ± 181.3	446.4 ± 39.3	196.6 ± 21.2	5.8 ± 1.0	34.4 ± 11.8	15.1 ± 2.1
	15	9	102.7 ± 7.3	206.4 ± 36.9‡	346.0 ± 22.0	119.6 ± 7.5	9.4 ± 1.2*	75.9 ± 14.6	18.0 ± 2.6
NGF	1	10	73.1 ± 10.5	928.0 ± 443.1	611.9 ± 52.1	247.0 ± 38.3	3.4 ± 0.1	84.9 ± 26.3	31.9 ± 6.2
	15	13	117.3 ± 15.8	57.8 ± 5.3	2000.4 ± 171.4†	1306.5 ± 132.0†	3.6 ± 0.1	1129.6 ± 60.2†	380.6 ± 27.3†
SNs	< 5	15	113.3 ± 7.9	81.7 ± 11.3	1464.4 ± 350.3†	1110.9 ± 357.6†	3.2 ± 0.1*	991.8 ± 216.7†	380.7 ± 106.3†

K^+-Ca^{2+} transient, depolarization-induced Ca^{2+} transient. C- Ca^{2+} transient, caffeine-induced Ca^{2+} transient. * $P < 0.05$; † $P < 0.0001$, compared with CTL 1 DIV. ‡ $n = 21$ for this group.

and that of SNs (Fig. 2E). Overall, these results suggest that the elevation of baseline Ca^{2+} levels in the control group after 5 and 10 days result, to some extent, from the increased frequency of spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations. However, comparison of corresponding data in Fig. 1(A and B), suggests that the differences cannot be explained solely by this factor. For instance, the large increase in baseline $[Ca^{2+}]_i$, seen in cells from the control group at 5 days, is disproportionate compared with the small increase in VOM seen between 1 and 5 days. In this case, cells could have experienced a genuine elevation of resting $[Ca^{2+}]_i$ as well.

The observation that after 15 days of NGF treatment, both baseline $[Ca^{2+}]_i$ levels and VOM of CCs became indistinguishable from those of SNs should be emphasized. These changes parallel the well-documented alterations in morphology and excitable properties, and represent the first clear indication that Ca^{2+} homeostasis in CCs becomes reorganized towards a pattern that gradually resembles that of SNs.

Alterations of voltage-gated Ca^{2+} transients in chromaffin cells

The majority of the Ca^{2+} influx in rat CCs is carried by L- and N-type Ca^{2+} channels (Gandía *et al.*, 1995). On the other hand, a variety of Ca^{2+} clearance mechanisms compete to extrude or sequester cytosolic Ca^{2+} from these cells (Park *et al.*, 1996). Because voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) are present in CCs throughout neuronal differentiation, and the magnitude and kinetics of Ca^{2+} transients depend on the interplay between Ca^{2+} influx and removal, we decided to examine first the effects of NGF on high K^+ -induced Ca^{2+} transients.

Figure 3(A and C) summarizes measurements of the peak amplitude of voltage-gated Ca^{2+} transients elicited in CCs and SNs by a high K^+ stimulation (subsequently termed K^+-Ca^{2+} transient). The maximal $d[Ca^{2+}]_i/dt$ of the K^+-Ca^{2+} transient was also measured (Fig. 3B and D; see Materials and methods for details). For this analysis, we only considered the K^+-Ca^{2+} transient elicited by the first of the three consecutive depolarizing pulses (see Fig. 3E). As shown in Fig. 3(A and B), both the magnitude and the maximal rate of rise of the K^+-Ca^{2+} transients in NGF-treated CCs increased significantly between 1 and 15 days ($P < 0.0001$; see Table 1). Interestingly, the latter values either slightly exceeded ($P = 0.038$) those of SNs, or were indistinguishable ($P = 0.43$), from them, respectively. The effects of NGF on Ca^{2+} mobilization through VGCCs are more apparent when the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$ is considered (compare Fig. 3A and B). In fact, while the peak amplitude increased 226% in the NGF group between 1 and 15 days, the peak rate of rise increased 430% ($P < 0.0003$). This corresponds to a 478% and 990% increase,

respectively, when NGF-treated and control CCs were compared ($P < 0.0001$; see Table 1). Figure 3(C and D) illustrates the time-course of NGF effects on the amplitude and rate of rise of the K⁺-Ca²⁺ transients. The peak amplitude (Fig. 3C) became significantly larger after 10 days ($P = 0.0013$). Similarly, the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$ started to be significantly different after 5 days ($P = 0.032$), and increased further after 10 days ($P = 0.005$; see Fig. 3D). The effects of NGF on the characteristics of K⁺-Ca²⁺ transients after 1 and 15 days, are illustrated in Fig. 3(E and F). Here, representative records and first derivative traces are shown, as well as Ca²⁺ records obtained from an SN. In all cases, notice that the response to the first depolarizing pulse shows the maximal $d[Ca^{2+}]_i/dt$. This is possibly due to Ca²⁺-dependent

partial inactivation of VGCCs during the slow decay of $[Ca^{2+}]_i$ rise that develops after the first membrane depolarization.

$[Ca^{2+}]_i$ clearance in CCs comprises several components that compete for cytosolic Ca²⁺ with different rates of extrusion or sequestration (Park *et al.*, 1996). Nevertheless, the fast initial decay component of a Ca²⁺ transient elicited by a short membrane depolarization can be well fitted with an exponential function with a single time constant (τ). Figure 4A compares the decay rates of K⁺-Ca²⁺ transients; after 1 day in culture, CCs from the control group, had a relatively slow decay, compared with cells from the NGF group ($P = 0.02$; see Table 1). As shown in Fig. 4B, after 15 days in culture, the decay rate of the control group became even slower, while that of the NGF group remained virtually unchanged ($P > 0.7$)

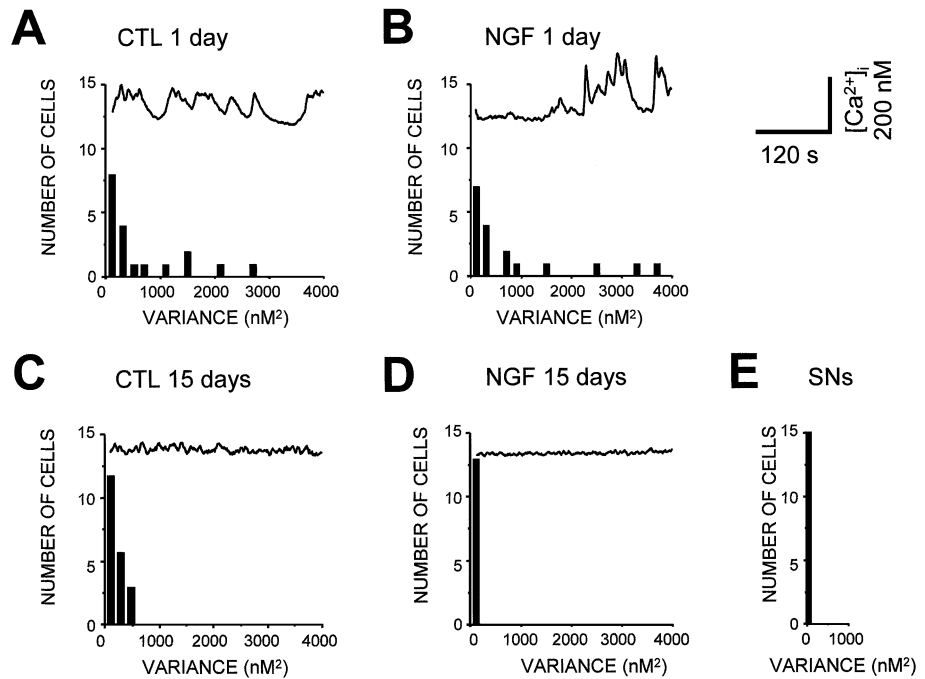
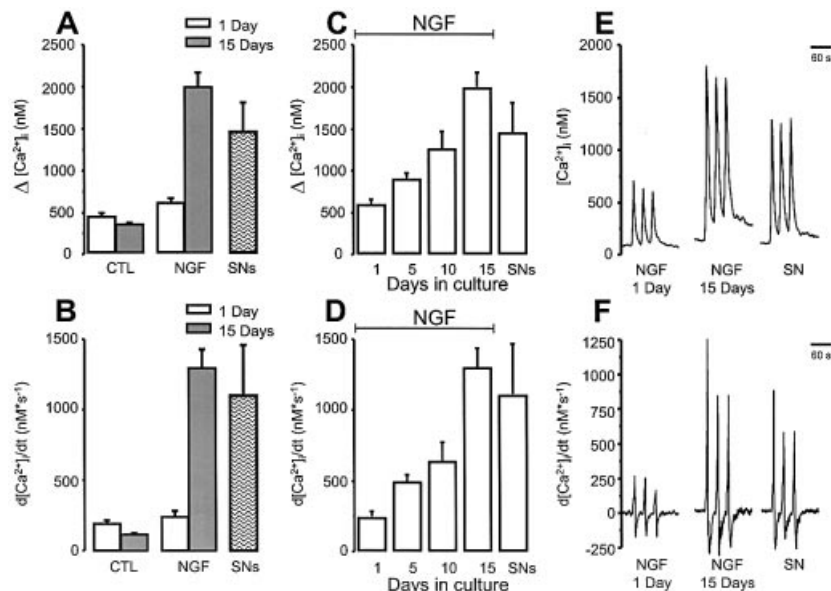


FIG. 2. Variance over the mean (VOM), plotted as frequency histograms for control (CTL) and nerve growth factor (NGF)-treated chromaffin cells (CCs). (A and B) Frequency histograms of VOM after 1 day *in vitro*. (C and D) Frequency histograms after 15 days *in vitro*. (E) Data from sympathetic neurons. Insets on top of each histogram are representative Ca²⁺ records from each group. Both groups reduced their spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations and narrowed their VOM distribution between days 1 and 15. NGF-treated CCs showed at the end, almost the same distribution as sympathetic neurons (SNs) (E). VOM distribution of the control (CTL) group also narrowed, but not as markedly as that of NGF-treated cells (compare A with C).

FIG. 3. Analysis of voltage-gated Ca²⁺ transients (K-Ca²⁺ transients) recorded from control (CTL) and nerve growth factor (NGF) chromaffin cells (CCs). (A) Mean amplitude of the first K-Ca²⁺ transient, plotted after 1 and 15 days *in vitro*. (B) Corresponding plots of the peak of the first derivative ($d[Ca^{2+}]_i/dt$) measured at the rising phase of the K-Ca²⁺ transients. (C) Time-dependent changes of the amplitude of the K-Ca²⁺ transients in NGF-treated CCs. (D) Corresponding plots of the peak of the first derivative ($d[Ca^{2+}]_i/dt$) from Ca²⁺ transients plotted in C. (A-D) Values obtained from sympathetic neurons (SNs) are shown for comparison. First derivative traces were digitally computed from the $[Ca^{2+}]_i$ records of each cell and peak values from cells each group were averaged. (E) Representative $[Ca^{2+}]_i$ records from NGF-treated CCs after 1 and 15 days *in vitro*. Cells were exposed to depolarizing high K⁺ solution by application of three brief pulses of pressure to a puffer pipette placed nearby. (F) Examples of first derivative traces calculated from corresponding $[Ca^{2+}]_i$ records.



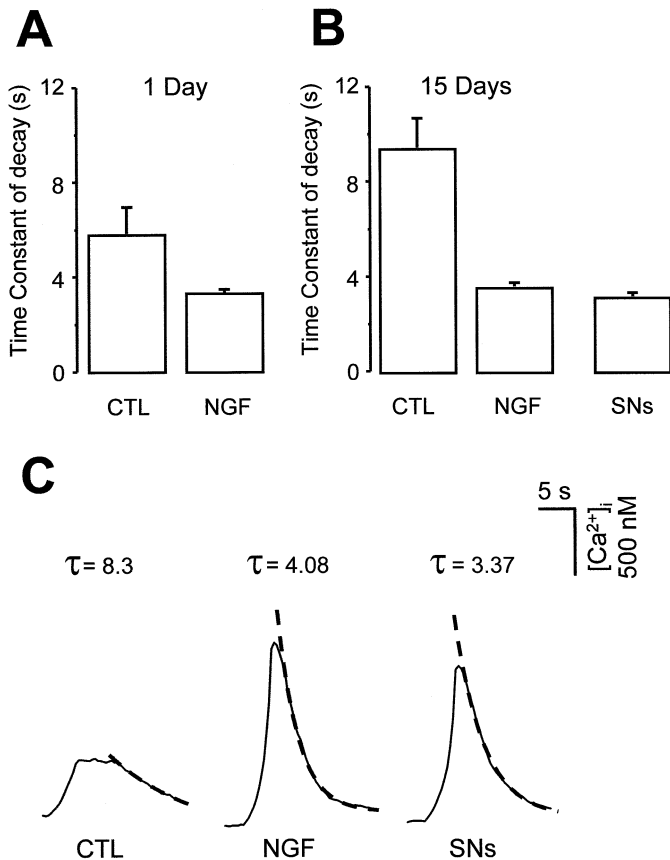


FIG. 4. Changes in the rate of clearance of $[Ca^{2+}]_i$ of $K-Ca^{2+}$ transients. The time constant of recovery (τ) was obtained by fitting a single exponential function to the decay of the $K-Ca^{2+}$ transients. (A and B) Comparison of mean τ -values obtained from cells grown either with or without nerve growth factor (NGF) after 1 and 15 days *in vitro*, respectively. Value from sympathetic neurons (SNs) is shown for comparison. After 15 days *in vitro*, cells from the control (CTL) group had significantly slower recovery than at day 1, whereas cells from the NGF-treated group accelerated their clearance rate since the first day of treatment. (C) Representative records of first $K-Ca^{2+}$ transients recorded from CTL and NGF-treated chromaffin cells (CCs) after 15 days *in vitro*. The dashed line superimposed on each record represents the single-exponential fit to the decay phase of the $K-Ca^{2+}$ transient.

and was indistinguishable from that of SNs ($P = 0.68$; see Table 1). Remarkably, the decay rate of the K^+-Ca^{2+} transients in CCs exposed to NGF increased from the first day in culture. These early effects of NGF differ from most other effects depicted in this work, which develop considerably more slowly (see Discussion). Figure 4C illustrates examples of K^+-Ca^{2+} transients elicited after 15 days in culture in control and NGF-treated CCs, as well as from an SN. These results suggest that during neural differentiation, one or more of the mechanism(s) responsible for the initial component of cytosolic Ca^{2+} clearance of CCs increases its efficacy and/or relative contribution (see Discussion).

Alterations of caffeine-induced Ca^{2+} mobilization in chromaffin cells

Like all eukaryotic cells, CCs and SNs possess rapidly exchanging intracellular Ca^{2+} stores, pertaining to the smooth endoplasmic reticulum (Thayer *et al.*, 1988; Kostyuk & Verkhatsky, 1994; Kuba, 1994; Park *et al.*, 1996; Verkhatsky & Shmigol, 1996; Usachev & Thayer, 1999). Ca^{2+} release from these stores is regulated by the

second messengers inositol 1,4,5-trisphosphate ($InsP_3$), or cyclic ADP ribose and Ca^{2+} (Furuichi *et al.*, 1994a). Stores from the latter kind possess Ca^{2+} -release channels that bind the alkaloid ryanodine with very high affinity (therefore called ryanodine receptors; RyRs), and are specifically activated by caffeine (Usachev *et al.*, 1993; Kuba, 1994; Usachev & Thayer, 1999). We began this part of our study by comparing the kinetics of caffeine-induced Ca^{2+} mobilization in CCs and SNs. Then, these responses were examined in CCs maintained in culture with or without NGF.

Figure 5 summarizes results obtained from examining Ca^{2+} transients elicited in CCs and SNs, by a 10-mM caffeine application (subsequently termed C- Ca^{2+} transients). As shown in Fig. 5(A and B), after 15 days of NGF treatment, CCs significantly increased both the magnitude and the maximal rate of rise of their C- Ca^{2+} transients compared with either 1 day of NGF treatment or 15 days under control conditions ($P < 0.0001$ in both cases). Moreover, the size of the C- Ca^{2+} transient in CCs became, on average, larger than that recorded from SNs (see Table 1). This difference, however, was not significantly different ($P = 0.19$), because of large variability of the SN data. In addition, the rate of rise of C- Ca^{2+} transients in NGF-treated CCs was nearly identical to that of SNs ($P = 0.99$; see Table 1). The effects of NGF on Ca^{2+} mobilization from caffeine-sensitive stores can also be examined by comparing the peak amplitude and the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$ (see Fig. 5A and B). Thus, in the group of NGF-treated CCs, the mean amplitude increased 1230%, while the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$ increased 1090% between days 1 and 15 ($P < 0.0001$). This augmentation represents a change of 1390% and 2000%, respectively, when compared with CCs grown for an equal length of time without NGF (see Table 1). Figure 5C and D shows the progression of NGF-induced increase in size and rate of rise, respectively, of the C- Ca^{2+} transients elicited in CCs. The differences, when compared with responses of CCs with 1 day in culture, or with the same number of days in control medium, were not statistically significant at 10 days ($0.16 < P < 0.79$), but became very significant after 15 days ($P < 0.0001$ in all cases). These results suggest that between 10 and 15 days of NGF treatment, CCs sustain a delayed, steep enhancement, both in the magnitude and rate of rise of caffeine-induced Ca^{2+} mobilization (see Discussion). Figure 5E and F shows representative records of C- Ca^{2+} transients obtained from CCs exposed to NGF for 1 and 15 days, and first derivatives computed from representative C- Ca^{2+} transients, respectively. Traces obtained from an SN are also shown. Typically, the C- Ca^{2+} transients of control CCs are small and plateau-like. In contrast, those of SNs are much larger and comprise an early, fast release that decays spontaneously, followed by a slower, sustained release that ends after the termination of the caffeine application (see Hernández-Cruz *et al.*, 1997). Interestingly, after >10 days of NGF exposure, the caffeine responses elicited in CCs became almost identical to those of SNs, comprising both release components. These changes in the kinetics of the C- Ca^{2+} transients are also reflected in their first derivatives (Fig. 5F). In particular, the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$, which denotes the maximal Ca^{2+} flux when the intracellular stores are fully loaded, increases drastically following NGF treatment (see Discussion).

It should be stressed that after 15 days of NGF treatment, the increase in rate of rise of the C- Ca^{2+} transient nearly doubles the corresponding increase in the rate of rise of the K^+-Ca^{2+} transient. This indicates that during neuronal differentiation of CCs, Ca^{2+} release from intracellular stores undergoes a more substantial increase, suggesting a privileged participation in intracellular Ca^{2+} signalling (see Discussion). Intriguingly, we noticed that after 5 days in the presence of NGF, the peak amplitude of C- Ca^{2+} transient decreased from 84.9 ± 26.3 nM,

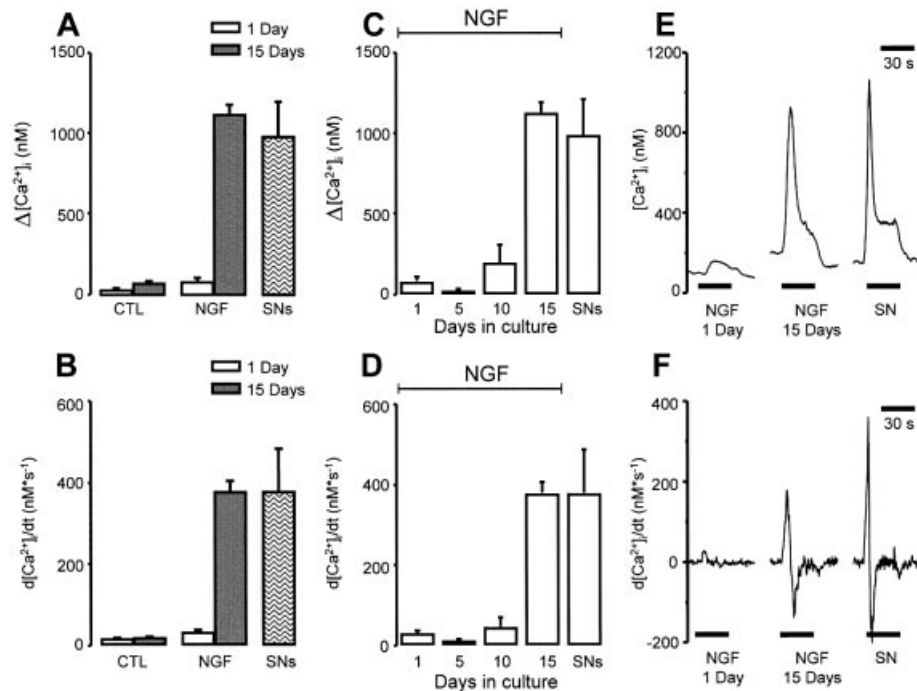


FIG. 5. Amplitude and rate of rise of Ca²⁺ transients elicited by application of 10 mM caffeine (C-Ca²⁺ transients). (A) Mean amplitudes of K-Ca²⁺ transients in control (CTL) and nerve growth factor (NGF)-treated chromaffin cells (CCs) after 1 and 15 days *in vitro*. (B) Corresponding plot of the peak first derivative ($d[Ca^{2+}]_i/dt$) obtained at the rising phase of C-Ca²⁺ transients. (C) Time-dependent changes of the peak amplitude of caffeine responses in NGF-treated cells. (D) Plot of the peak first derivative ($d[Ca^{2+}]_i/dt$) obtained from the corresponding C-Ca²⁺ transients. (A–D) Values obtained from sympathetic neurons (SNs) are shown for comparison. First derivative traces were computed from $[Ca^{2+}]_i$ records taken from each individual cell and peak values of the group were averaged. (E) Representative $[Ca^{2+}]_i$ records obtained from NGF-treated CCs after 1 and 15 days *in vitro*. Traces obtained from an SN are shown for comparison. Cells from the different groups were exposed to 10 mM caffeine with a puffer pipette (10 p.s.i.; 30 s, indicated with the horizontal line under each record). In the cell treated for 15 days with NGF, caffeine responses show the spike-plateau pattern that is characteristic of the sympathetic neuron responses. (F) Examples of first derivative traces calculated from the corresponding $[Ca^{2+}]_i$ records in E.

$n = 8$, to 29.2 ± 8.2 nM, $n = 17$ (see Fig. 5C). This reduction did not turn out to be statistically significant ($P = 0.63$), but this could result from the way the peak amplitude was measured. To better assess the possibility that Ca²⁺ release from intracellular stores could be transiently inhibited during the first week in culture, the data were further analysed by determining the time integral (area under the curve) of the C-Ca²⁺ transient. This parameter provides additional information about magnitude and direction of Ca²⁺ fluxes associated with the application of caffeine rather than the peak amplitude itself. Figure 6A summarizes the results of measuring the area under the C-Ca²⁺ transients over the 30-s duration of caffeine application. Results from the control group showed that, on average, the time integral of the caffeine response, which is net positive after 1 day in culture (316 ± 291.1 nM s, $n = 19$), became net negative after 5 and 10 days (-1595.1 ± 449.2 nM s; $n = 26$ and -325.3 ± 245.2 nM s; $n = 23$, respectively). These differences are marginally significantly different after 5 days ($P = 0.18$), probably because of the large dispersion of the data. Negative values for the mean time integral are explained because, in a number of cases, caffeine produced either a transient small increase in $[Ca^{2+}]_i$ followed by an 'undershoot', or simply a downward excursion below baseline $[Ca^{2+}]_i$. These paradoxical responses were present since 1 day in culture (31% of cells), became more frequent at day 5 (77% of cells), and gradually diminished until their complete disappearance by day 15. As shown in Fig. 6(A and B), the phenomenon was

also present, although to a lesser extent, in the group of NGF-treated cells. Here, the mean time integral increases transiently after 1 day ($P = 0.08$), diminishes between 5 and 10 days, and then dramatically increases at 15 days, giving a significant difference when compared with cells from the control group at either day 1 or day 15 *in vitro* ($P < 0.0001$ and $P = 0.004$, respectively). The number of cells that showed descending caffeine responses was 12.5% at day 1 and 17% at day 5 of NGF treatment. These responses were absent at later times. Figure 6B shows examples of C-Ca²⁺ transients obtained from CCs at different stages of NGF treatment. Notice that at 5 days, caffeine mostly elicits a downward deflection of $[Ca^{2+}]_i$, while at 10 days, a delayed, small response to caffeine is observed. Together, these results suggest that the reduction in amplitude of the C-Ca²⁺ transient at 5 days, and that of the area under the C-Ca²⁺ transient at 5 and 10 days, regardless of treatment, are genuine (see Discussion).

NGF-induced changes in the immunocytochemistry of ryanodine receptors

Three distinct isoforms of ryanodine receptors (RyRs) have been identified: skeletal (RyR₁), cardiac (RyR₂) and brain (RyR₃) subtypes (reviewed by Furuichi *et al.*, 1994a), with the most abundant form expressed in brain closely resembling RyR₂ (Kuwajima *et al.*, 1992; Lai *et al.*, 1992; Furuichi *et al.*, 1994b). The different kinetic properties of C-Ca²⁺ transients recorded in CCs and SNs could result

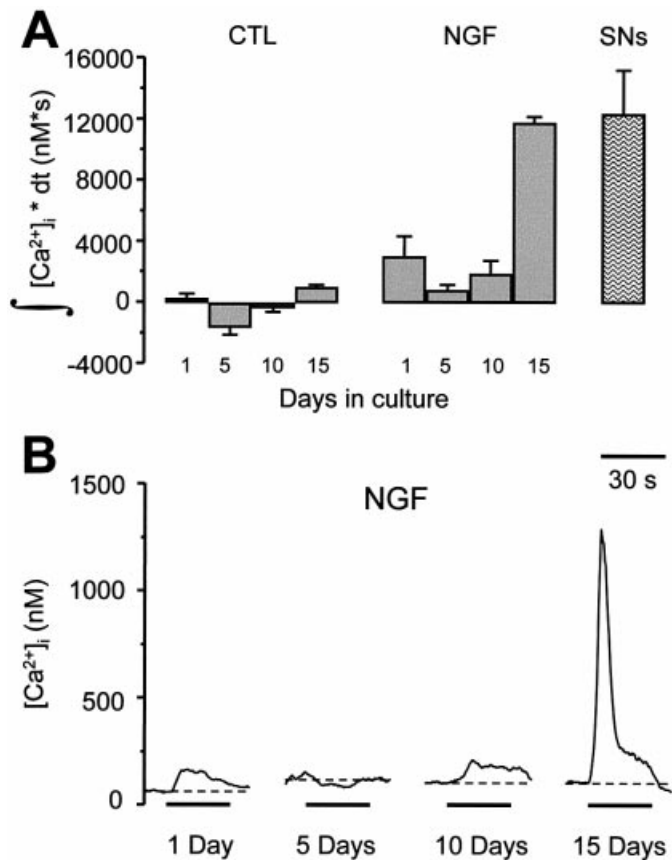


FIG. 6. Time-course of changes in the time integral of the C-Ca²⁺ transients. (A) Plots of the mean time integral of the C-Ca²⁺ transients from control (CTL) and nerve growth factor (NGF)-treated cells as a function of time *in vitro*. The values from sympathetic neurons (SNs) are shown for comparison. The baseline-subtracted area was measured by digital integration of the C-Ca²⁺ transients over the duration of the caffeine application (30 s). (B) Representative records of C-Ca²⁺ transients obtained from chromaffin cells (CCs) at different stages of NGF treatment. At 5 days, caffeine application (indicated with the horizontal line), elicits mostly a downward deflection of [Ca²⁺]_i. A delayed, small response was observed after 10 days.

from differences in the expression pattern of RyRs. Also, the marked augmentation of caffeine responses in CCs after NGF exposure could be due to changes in synthesis of one or more RyRs isoforms. To assess this possibility, we examined the protein immunoreactivity profile for the three isoforms of RyRs, first in postnatal CCs and SNs, and then in CCs undergoing neuronal differentiation.

Figure 7 shows protein immunofluorescence of the RyR isoforms measured in CCs maintained for 1 and 15 days, in either control medium or in the presence of NGF. Specific fluorescence was obtained by subtracting background and nonspecific fluorescence (see Materials and methods for details). Immunostaining of SNs and CHO cells, a mammalian cell line that lacks expression of RyRs (Bhat *et al.*, 1999), was measured for comparison. As illustrated in Fig. 7A, the skeletal isoform of the RyR was present both in CCs and in SNs, with specific fluorescence significantly higher than in negative controls (CHO cells; $P < 0.0001$). After 15 days in culture, and regardless of treatment, protein immunofluorescence of RyR₁ decreased in CCs to levels similar to those of negative controls ($P = 0.09$ and 0.25 , control and NGF groups, respectively).

As shown in Fig. 7C, the brain isoform of RyRs was present in CCs, although at relatively low levels. The difference of specific

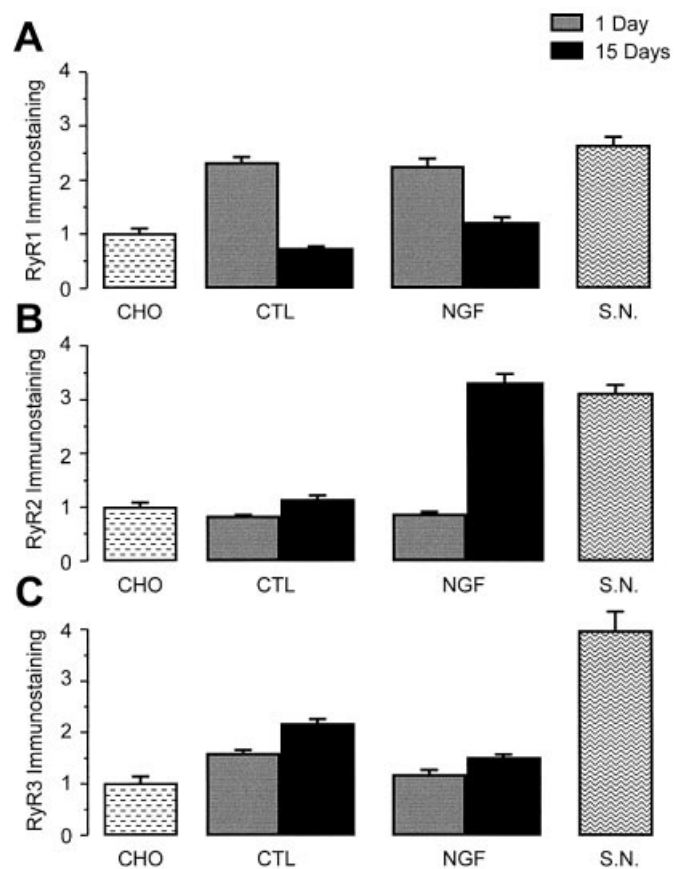


FIG. 7. Immunostaining of ryanodine receptor proteins (RyRs) in chromaffin cells (CCs). (A–C) Specific immunostaining for RyR₁, RyR₂ and RyR₃, respectively, after 1 and 15 days in the presence or in the absence of nerve growth factor (NGF). Immunostaining of rat sympathetic neurons (SNs; positive control) and of a cell line lacking RyRs (Chinese hamster ovary cells, CHO; negative control) are also plotted for comparison.

fluorescence between CHO cells and control CCs grown for 1 day was barely significant ($P = 0.003$). In contrast, RyR₃ protein was abundant in SNs, with levels greatly exceeding those of negative controls ($P < 0.0001$). The mean value obtained from these cells [36.6 ± 3.5 a.u. (arbitrary units)], was 150% larger than that of control CCs (14.5 ± 0.6 a.u.). After 15 days, the level of RyR₃ immunostaining in CCs increased modestly. This increase was more significant in CCs from the control group ($P < 0.0001$) than in CCs grown in the presence of NGF ($P = 0.025$). Nevertheless, the level of RyR₃ immunofluorescence in SNs was still 2.6-fold higher than in CCs even after 15 days NGF treatment ($P < 0.0001$). Taken together, these results suggest that protein synthesis of RyR₁ and RyR₃ subunits is not markedly regulated by NGF treatment, while unknown factors appear to regulate the expression of RyR₃ in SNs.

A different picture emerges when RyR₂ protein immunolabeling is considered. As shown in Fig. 7B, the RyR₂ isoform was not present in postnatal CCs, or was present at very low levels; specific fluorescence of CCs cultured for 1 day in either condition was not significantly different from those of CHO cells ($P = 0.12$ and 0.5 ; control and NGF, respectively). In contrast, RyR₂ was abundantly expressed in SNs, with levels greatly exceeding those of negative controls ($P < 0.0001$). Moreover, the mean value of immunostaining obtained from these cells (40.22 ± 2.0 a.u.), was 3.8-fold higher than that of control CCs (10.6 ± 0.3 a.u.). Specific

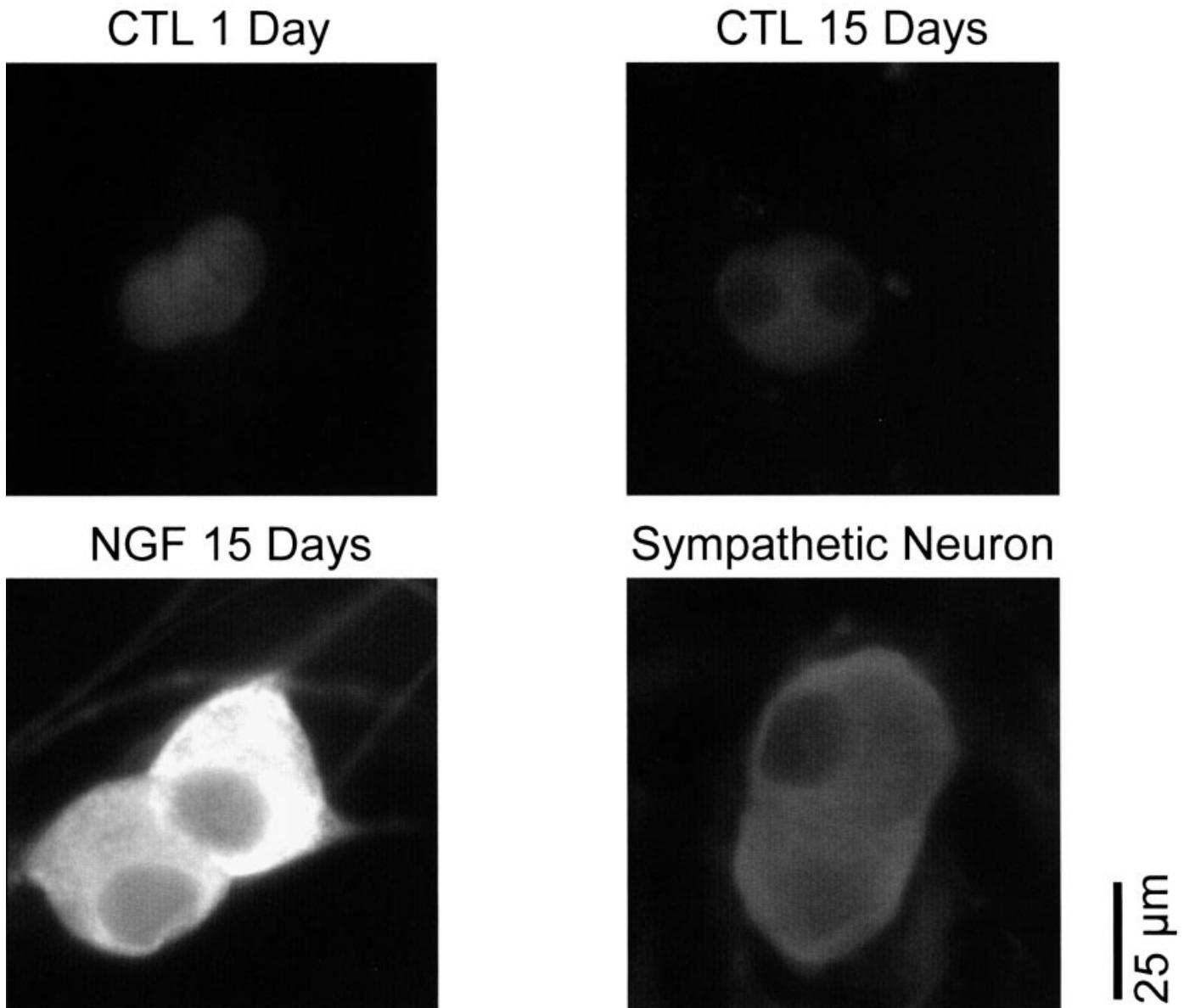


FIG. 8. Representative images obtained with digital fluorescence microscopy from chromaffin cells (CCs) and sympathetic neurons (SNs) immunostained with antibodies raised against the cardiac isoform of the ryanodine receptor, RyR₂. Examples of CCs from the control (CTL) group after 1 and 15 days *in vitro* are shown at the same magnification and intensity level. For comparison, this plate also shows examples of sympathetic neurons maintained for 3 days *in vitro*. Notice that after 15 days *in vitro*, the morphological transformation of nerve growth factor (NGF)-treated CCs into sympathetic neuron-like cells is paralleled by a substantial increase in RyR₂ protein immunofluorescence.

RyR₂ immunolabelling increased significantly at day 5 in CCs from the control group ($P < 0.0001$). However, this increased immunofluorescence (162% over that of control cells at day 1 in culture) disappeared after 15 days *in vitro*, returning to levels similar to those of negative controls.

In NGF-treated CCs, RyR₂ immunofluorescence increased progressively and monotonically, from 11.12 ± 0.6 a.u. at day 1 to 19.6 ± 1.2 after 5 days, 26.15 ± 1.1 after 10 days and 42.76 ± 2.1 after 15 days. These differences were significant starting from day 5 of NGF exposure ($P < 0.0001$). After 15 days of NGF treatment, immunofluorescence increased by 280%, reaching levels similar to those of SNs (40.22 ± 2.0 a.u.; $P = 0.4$). To determine if this trend of NGF-induced progressive increase in immunostaining continued after 15 days of treatment, a sister culture of CCs was maintained for

20 days in NGF treatment. The mean immunolabelling measured (58.1 ± 2.8 a.u.) indicates that after prolonged treatment with NGF, the synthesis of RyR₂ proteins continued, exceeding immunolabelling of SNs. Figure 8 illustrates representative fluorescence microscopy images obtained from CCs and SNs immunolabelled with antibodies raised against the RyR₂. Notice that CCs treated with NGF for 15 days show, as well as an evident morphological transformation into SN-like cells, a drastic increase in RyR₂ protein immunofluorescence. The increased expression of RyR₂ staining shown in Figs 7B and 8, appears to be positively correlated with the augmentation of caffeine-induced Ca²⁺ release (see Fig. 5C and D). To examine this correlation more closely, the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$ of caffeine responses elicited after 1, 5, 10 and 15 days in culture were plotted with the corresponding levels of RyR₂ immunostaining (see Fig. 9). Notice

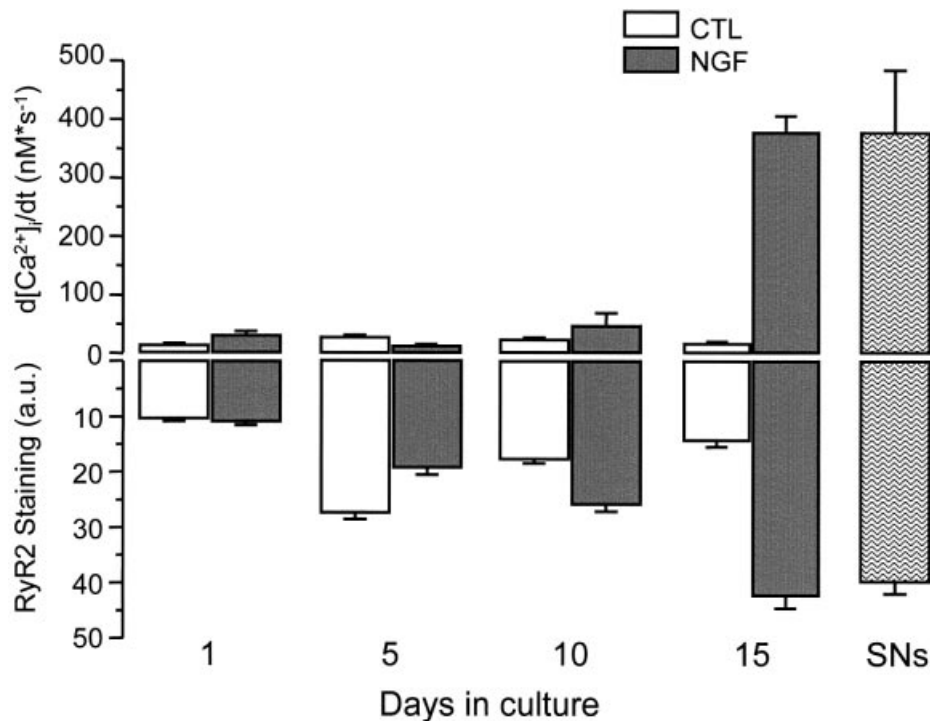


FIG. 9. Comparison of the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$ of Ca^{2+} transients elicited by caffeine application in chromaffin cells after 1, 5, 10 and 15 days *in vitro*, and the corresponding levels of RyR₂ immunolabelling determined in cells from sister cultures. In the control (CTL) chromaffin cells (CCs), notice that between 1 and 10 days, RyR₂ immunostaining varies between 10 and 27 a.u., while the $d[Ca^{2+}]_i/dt$ of the caffeine responses remains low (< 50 nM/s). In contrast, a relatively modest (63%) further increase of RyR₂ immunolabelling in the nerve growth factor (NGF)-treated group between 10 and 15 days is followed by a large (600%) increase of the peak $d[Ca^{2+}]_i/dt$.

that although RyR₂ immunostaining varied between 10.5 and 27.8 a.u. in control CCs throughout the 15 days *in vitro*, the $d[Ca^{2+}]_i/dt$ of the caffeine response remained low (< 50 nM/s), indicating a low rate of Ca^{2+} release. In contrast, between 10 and 15 days, the latter increased rather explosively (600%) in the group of NGF-treated CCs, with a relatively small concomitant increase (63%) in RyR₂ immunolabelling. Here, one should bear in mind that the maximal $d[Ca^{2+}]_i/dt$ reflects more closely the peak magnitude of the underlying Ca^{2+} efflux from intracellular stores than the amplitude of the Ca^{2+} transient.

Together, these data strongly suggest that the synthesis of proteins coded by RyR₂ is significantly upregulated by NGF. The increased synthesis of RyR₂ and the enhanced contribution of Ca^{2+} signalling mediated by caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in CCs, parallel the remarkable morphological and functional changes associated with the acquisition of the neuronal phenotype.

Discussion

Ca^{2+} homeostasis and dynamics of excitable cells are determined primarily by the nature and distribution of proteins with specific Ca^{2+} handling functions, such as Ca^{2+} channels, buffers and pumps. Very little is known about factors that influence the timely expression of these proteins in either developing or mature vertebrate neurons. The present study is, to our knowledge, the first where effects of NGF in postnatal CCs are used to assess changes in Ca^{2+} homeostasis associated with the acquisition of a neuronal phenotype.

Distinctive profiles of Ca^{2+} homeostasis and dynamics in adrenal chromaffin cells and sympathetic neurons

Baseline Ca^{2+} levels in CCs were found slightly elevated in postnatal SNs. These findings agree with reports that resting $[Ca^{2+}]_i$ increases after 24 h of NGF treatment in neonatal rat SNs (Itoh *et al.*, 1998). NGF also increases resting $[Ca^{2+}]_i$ levels in PC12 cells (Bush *et al.*, 1991). Basal $[Ca^{2+}]_i$ of developing neural crest-derived neurons also increases gradually during maturation (Koike & Tanaka, 1991). Thus, CCs mimic 'immature' SNs.

Spontaneous and agonist-evoked Ca^{2+} oscillations, which are characteristic of the rat chromaffin phenotype (Malgaroli & Meldonesi, 1991; D'Andrea *et al.*, 1993), depend on Ca^{2+} release from InsP₃-sensitive intracellular stores and possibly Ca^{2+} entry (D'Andrea & Thorn, 1996). Our study showed that spontaneous Ca^{2+} fluctuations were frequent in CCs and virtually absent in SNs. Accordingly, the variance over the mean baseline $[Ca^{2+}]_i$ was sevenfold higher in CCs than in SNs. The tendency of SNs to maintain steady $[Ca^{2+}]_i$ levels has been reported previously (Itoh *et al.*, 1998), although they can display spontaneous Ca^{2+} oscillations if the Ca^{2+} sensitivity of RyR Ca^{2+} -release channels is enhanced (Malgaroli *et al.*, 1990; Friel & Tsien, 1992a; Nohmi *et al.*, 1992a; Kuba, 1994; Itoh *et al.*, 1998; Usachev & Thayer, 1999).

SNs and CCs showed marked differences in the magnitude and rate of rise and decay of Ca^{2+} transients induced by membrane depolarization. These responses were 3.3-fold bigger, developed 5.6-fold faster and decayed nearly twofold faster in SNs compared with CCs (see Table 1). In addition, caffeine-induced Ca^{2+} mobilization was 28-fold larger and developed 25-fold faster in

SNs than in CCs (see Table 1). Also, caffeine responses were small and plateau-like in CCs, while they were bigger and involved transient and sustained Ca²⁺-release components in SNs.

The basis for these differences in Ca²⁺ homeostasis and dynamics must reside in the differential expression of VGCCs, caffeine-sensitive Ca²⁺ stores and Ca²⁺ buffering and sequestration. These properties, which develop autonomously in CCs and SNs, probably serve particular functions of either cell type. For instance, spontaneous Ca²⁺ oscillations explain the high level of nonstimulated catecholamine release typical of rat CCs (Malgaroli & Meldolesi, 1991). Nevertheless, as this study shows, the pattern of Ca²⁺ homeostasis and dynamics of postnatal CCs is plastic, i.e., their characteristics are not irreversibly determined.

The abatement of spontaneous Ca²⁺ fluctuations in chromaffin cells. An indication of neural differentiation?

At 5 days *in vitro*, control CCs increased both baseline [Ca²⁺]_i levels and the frequency and amplitude of spontaneous [Ca²⁺]_i fluctuations. After this initial rise, the spontaneous activity diminished until it ceased after 15 days in culture. Aside from the mechanisms that underlie the natural termination of Ca²⁺ fluctuations, it was shown that NGF further inhibited these oscillations, possibly by promoting Ca²⁺ removal (discussed later). This was most apparent at 5 days *in vitro*, when NGF nearly abolished the enhanced oscillatory activity seen in control CCs (Fig. 1B). In this regard, it is interesting that NGF also suppressed [Ca²⁺]_i oscillations of immature SNs upon caffeine stimulation (Itoh *et al.*, 1998). The loss of spontaneous fluctuations in CCs may denote the first indication of a reorganization of Ca²⁺ homeostasis towards an SN-like phenotype.

Basis for the NGF-induced augmentation of voltage-gated Ca²⁺ transients in adrenal chromaffin cells

The amplitude and rate of rise of depolarization-induced Ca²⁺ transients of CCs increased gradually in the presence of NGF. These changes are most likely associated with the NGF-induced augmentation in the density of voltage-gated Ca²⁺ currents reported for CCs (Morgado-Valle *et al.*, 1998). In that study, Ca²⁺ current density increased 2.9-fold after 1 week of NGF treatment compared with the control. Assuming that the maximal d[Ca²⁺]_i/dt of the Ca²⁺ transient reflects more closely the size of the underlying Ca²⁺ influx (Song *et al.*, 1998), the increase in Ca²⁺ current density compares favourably with the 5.3-fold increase in the maximal d[Ca²⁺]_i/dt after 15 days of NGF exposure (see Table 1). Nevertheless, the magnitude and kinetics of voltage-gated Ca²⁺ transients do not depend exclusively on Ca²⁺ influx, but also on its interplay with intracellular Ca²⁺ release and removal. Thus, alterations in the relative contribution of these mechanisms cannot be ruled out *a priori*.

The rate of decay of the K⁺-Ca²⁺ transients increased after NGF treatment, suggesting that fast clearing of Ca²⁺ from the cytosol became more efficient. This finding rules out the possibility that the enhancement of voltage-gated Ca²⁺ transient resulted from poor Ca²⁺ buffering. On the other hand, NGF treatment also increased caffeine-induced Ca²⁺ release, thus favouring a possible contribution of intracellular Ca²⁺ release to the amplitude of the K⁺-Ca²⁺ transient. This possibility cannot be ruled out with data from this study, although previous work from this laboratory showed that Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) contributes modestly to K⁺-Ca²⁺ transients in rat SNs (Hernández-Cruz *et al.*, 1990, 1997). Maturation of cerebellar granule cells leads to a similar increase of depolarization-induced Ca²⁺ transients (Ciardo & Meldolesi, 1991; Mhyre *et al.*, 2000).

The rate of Ca²⁺ removal in CCs increases rather quickly after 1 day of NGF treatment. This delay is significantly shorter than the length of time required for the development of other changes reported here, possibly leading to the perception that effects on the rate of Ca²⁺ clearance do not involve gene transcription. Nonetheless, numerous reports exist where NGF effects appear after latencies ranging from minutes to a few hours. These include changes in cell surface morphology (Connolly *et al.*, 1981), neurite elongation and growth cone movements (Seeley & Greene, 1983), Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ mobilization (Jiang *et al.*, 1999), regulation of Na⁺/K⁺ pump (Boonstra *et al.*, 1982), Na⁺/Ca²⁺ exchanger (Pitchford *et al.*, 1995), and voltage-gated Ca²⁺ channels (Jia *et al.*, 1999), as well as changes in the synthesis of ≈ 20 proteins (Hondermarck *et al.*, 1994). These rapid changes set a lower limit for the time needed for the NGF receptor to generate the signals required to stimulate gene transcription.

Alterations in the kinetics and amplitude of caffeine-induced Ca²⁺ transients in CCs after NGF-treatment. A hallmark for neuronal differentiation?

The presence of RyRs and caffeine-sensitive intracellular Ca²⁺ stores in nerve cells is amply accepted, although their functional role remains elusive (reviewed by Kostyuk & Verkhratsky, 1994; Kuba, 1994; Verkhratsky & Shmigol, 1996; Usachev & Thayer, 1999). Because caffeine is an effective activator of Ca²⁺ release through RyRs in both CCs and SNs, we decided to explore changes in caffeine responses resulting from NGF treatment in CCs. The aim of these experiments was to determine if the acquisition of the neuronal phenotype is associated with a functional reorganization of intracellular Ca²⁺ stores. As shown earlier, Ca²⁺ release from intracellular stores was, on average, 14-fold bigger, and developed 21-fold faster in NGF-treated compared with NGF-deficient CCs. This suggests that the store's content of releasable Ca²⁺ or the density of RyRs, or both increased upon NGF exposure. The properties of RyRs could have been altered as well. Caffeine responses of NGF-treated CCs did not only increase in size, but they also exhibited an early transient peak followed by a slow, sustained release. In SNs, the transient release component involves an all-or-none regenerative process, sustained by CICR (Hernández-Cruz *et al.*, 1997). The emergence of a prominent transient release component in CCs is perhaps the most compelling finding of this study. In the context of the present work, this feature appears to be a hallmark of a sympathetic neuronal character.

Of the many features that could determine changes in the size of caffeine responses, we only examined the expression pattern of RyR immunoreactivity, which is related to the density of RyRs. In the group of NGF-treated cells, the level of RyR₂ immunostaining (but not that of RyR₁ or RyR₃) increased concomitantly with the size of the caffeine response, suggesting a close link between the expression of the cardiac RyR isoform, and a 'neuronal' Ca²⁺ release. Nevertheless, it should be pointed out that RyR₂ immunofluorescence also increased transiently at day 5 in the control group, without a parallel increase in the caffeine response (see Fig. 9). The significance of this transient increase in RyR₂ immunofluorescence is difficult to interpret without further information.

Changes in RyR₂ immunoreactivity and caffeine responses in NGF-treated CCs were not linearly correlated, particularly at later times in culture. Initially, RyR₂ immunoreactivity increased, while caffeine responses grew very little or even declined. Then, in the brief lapse between 10 and 15 days, RyR₂ immunoreactivity increased 63%, while the amplitude and the maximal d[Ca²⁺]_i/dt of the caffeine response grew by 460% and 600%, respectively (see Figs 5 and 9). This disparity could reflect the late emergence of a nonlinearity in the

release process. We speculate that this behaviour could result from the regenerative nature of CICR. Thus, our findings are consistent with the notion that neuronal differentiation involves both an increased synthesis of RyR₂ and an improvement of the functional coupling among them, resulting in CICR with higher feedback gain. Undoubtedly, this interesting possibility deserves further examination.

Significance of the caffeine-induced downward deflections in baseline $[Ca^{2+}]_i$

Besides stimulating Ca²⁺ release, caffeine promotes Ca²⁺ uptake, either indirectly by depleting stores (Cseresnyés *et al.*, 1997), or directly by stimulating sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPases (SERCA pumps; Orkand & Thomas, 1995). This augmentation of Ca²⁺ uptake accounts for $[Ca^{2+}]_i$ undershoots seen immediately after the termination of caffeine applications (Friel & Tsien, 1992b; Nohmi *et al.*, 1992a; Orkand & Thomas, 1995). According to this notion, the magnitude and kinetics of the C–Ca²⁺ transient are determined by the contribution of two opposing Ca²⁺ mobilization processes.

CCs exposed to NGF for >10 days showed a large increase in caffeine-induced Ca²⁺ mobilization. Nevertheless, after 5 days in the presence of NGF, the amplitude of their C–Ca²⁺ transients diminished as compared with cells with 1 day of NGF exposure (Fig. 5C). Similarly, the area under the C–Ca²⁺ transient declined after 5 and 10 days of NGF treatment (Fig. 6A). The number of cells showing downward caffeine responses is largest in the control group after 1 and 5 days, while NGF reduced the frequency of these responses. A possible explanation for these observations is that caffeine actions on intracellular Ca²⁺ mobilization evolve differently *in vitro* under the different experimental conditions. Thus, the biphasic behaviour exhibited by NGF-treated CCs could result from a functional transition, whereby caffeine-stimulated uptake is prevalent at early times of neuronal differentiation, and caffeine-induced release becomes the dominant mechanism at later times. Understanding the nature of the processes involved in determining the relative contribution of these opposing mechanisms requires further investigation.

The fast decay of $[Ca^{2+}]_i$ seen immediately after a caffeine-induced Ca²⁺ release in amphibian SNs results from the activation of a fast re-uptake mechanism called release-activated Ca²⁺ transport (RACT; Cseresnyés *et al.*, 1997). It could be argued that an increased expression of the protein(s) responsible for RACT could underlie downward caffeine responses seen in CCs between 5 and 10 days in culture. Besides the fact that RACT has not been demonstrated in CCs, we believe that this possibility is unlikely, mainly for two reasons. First, the activation of RACT requires a local increase of $[Ca^{2+}]_i$ near the ER (Cseresnyés *et al.*, 1997). However, either a very small Ca²⁺ release or none at all preceded the downward excursion of $[Ca^{2+}]_i$ upon caffeine application (see Fig. 6B). Second, RACT diminished significantly during long applications of caffeine, presumably because maintained release ‘shunts’ the transport mechanism (Cseresnyés *et al.*, 1997). Nevertheless, the decrease in $[Ca^{2+}]_i$ below baseline in CCs, occurred during the application of caffeine, when RACT should be inhibited. A rebound $[Ca^{2+}]_i$ rise was often seen immediately after the termination of the caffeine application (data not shown), supporting the notion that the increased Ca²⁺ uptake develops during caffeine application, not after.

Does neuronal differentiation merely involve the enhancement of functions already present in chromaffin cells?

NGF-induced neuronal differentiation of CCs involves an increased function of plasmalemmal VGCCs, Ca²⁺-release channels and Ca²⁺ clearance mechanisms. All these functions are present, albeit some of

them in a rudimentary manner, in postnatal CCs. A question that might be raised is whether differentiation involves the appearance of new properties, or if it simply consists of the augmentation of pre-existent ones. In the case of voltage-gated Ca²⁺ influx or Ca²⁺ removal, the answer probably could be that their participation simply becomes more conspicuous. Nevertheless, in the case of caffeine-induced Ca²⁺ mobilization, it can be argued that qualitatively different properties arise because their contribution increases so immoderately.

Interactions between neighbouring RyRs is intrinsic to common pool models of CICR, provided that they are sufficiently close to one another so that they respond to each other's released Ca²⁺. Therefore, it has been proposed on theoretical grounds that Ca²⁺-mediated interactions between neighbouring RyRs become highly cooperative when their density surpasses a critical level (Stern, 1992). The emergence of regenerative Ca²⁺-release phenomena in CCs suggests the development of more significant interactions between neighbouring release channels. The development of this new feature has deep implications in their ability to amplify stimuli mediated by intracellular Ca²⁺ signalling. Further studies are needed to test this hypothesis, but if our tentative interpretation is correct, it should be possible to take advantage of this *in vitro* differentiation model to directly examine possible changes in the microarchitecture of intracellular Ca²⁺ stores associated with the advent of large-scale CICR.

The main hypothesis that underlies this study is that changes in Ca²⁺ homeostasis and dynamics in differentiating CCs recapitulate changes occurring during maturation of SNs *in vivo*. Thus, one may speculate that the late increase in CICR mediated by the increased expression of RyR₂ may be crucial to differentiating neurons by allowing them to respond to environmental cues, as well as to generate localized Ca²⁺ signals. CICR also can permit signals originating from a small cellular region to propagate to a larger or different cytosolic region. For instance, in developing amphibian spinal neurons and regenerating dorsal root ganglion neurons, CICR participates in directing Ca²⁺ transients towards the neuronal nuclei (Holliday *et al.*, 1991; Spitzer, 1994; Utzschneider *et al.*, 1994).

In postnatal SNs, CICR appears to be designed to favour amplification of Ca²⁺ signals originated from intracellular sources like InsP₃ or ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores themselves (Hernández-Cruz *et al.*, 1997), thus improving signal to noise ratio by intensifying Ca²⁺ gradients generated by agonist-induced intracellular Ca²⁺ release. It is conceivable that newly developed cardiac-type RyRs can perform similar functions in NGF-treated CCs.

Acknowledgements

The authors are indebted to Drs Luis Vaca, Agustín Guerrero and David García for many useful discussions, and Drs Marcia Hiriart and Fredy Cifuentes for reviewing an earlier version of this manuscript. We also thank Georgina Guerrero for preparing and maintaining primary cell cultures, Tatiana Fiordelisio for advice on immunostaining and Drs Myrna Dent and Anthony Lai for providing RyR antibodies. This work was supported by grants from DGAPA IN204497 and CONACyT 25261-N (México) to A. Hernández-Cruz. This work was conducted by N. Jiménez in partial fulfilment of his PhD thesis. For that purpose he was awarded a fellowship from CONACyT.

Abbreviations

a.u., arbitrary units; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium concentration; CC, chromaffin cell; CHO, Chinese hamster ovary; CICR, calcium-induced calcium release; DMEM, Dulbecco's modified eagle medium; FBS, fetal bovine serum; InsP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; NGF, nerve growth factor;

PBS, phosphate-buffered saline; RACT, release-activated Ca²⁺ transport; RyR, ryanodine receptor; SN, sympathetic neuron; VGCC, voltage-gated Ca²⁺ channel; VOM, variance over the mean.

References

- Anderson, D.J. (1993) Molecular control of cell fate in the neural crest: The sympathoadrenal lineage. *Annu. Rev. Neurosci.*, **16**, 129–158.
- Bhat, M.B., Hayek, S.M., Zhao, J., Zang, W., Takeshima, H., Wier, W.G. & Ma, J. (1999) Expression and functional characterization of the cardiac muscle ryanodine receptor Ca²⁺ release channel in chinese hamster ovary cells. *Biophys. J.*, **77**, 808–816.
- Boonstra, J., Skaper, S.D. & Varon, S. (1982) Regulation of Na⁺,K⁺ pump activity by nerve growth factor in chick embryo dorsal root ganglion cells. *J. Cell. Physiol.*, **113**, 28–34.
- Bush, A.B., Barden, L.A., Greene, L.A. & Maxfield, F.R. (1991) Nerve growth factor potentiates bradykinin-induced calcium influx and release in PC12 cells. *J. Neurochem.*, **57**, 562–574.
- Ciaro, A. & Meldolesi, J. (1991) Regulation of intracellular calcium in cerebellar granule neurons: effects of depolarization and of glutamatergic and cholinergic stimulation. *J. Neurochem.*, **56**, 184–191.
- Connolly, J.L., Green, S.A. & Greene, L.A. (1981) Pit formation and rapid changes in surface morphology of sympathetic neurons in response to nerve growth factor. *J. Cell. Biol.*, **90**, 176–180.
- Cserenyés, Z., Bustamante, A.I., Klein, M.G. & Schneider, M.F. (1997) Release-activated Ca²⁺ transport in neurons of frog sympathetic ganglia. *Neuron*, **19**, 403–419.
- D'Andrea, P., Codazzi, F., Zacchetti, D., Meldolesi, J. & Grohovaz, F. (1993) Mechanism of [Ca²⁺]_i oscillations in rat chromaffin cells: Complex Ca²⁺-dependent regulation by a ryanodine-insensitive oscillator. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15213–15220.
- D'Andrea, P. & Thorn, P. (1996) Ca²⁺ signalling in rat chromaffin cells: interplay between Ca²⁺ release from intracellular stores and membrane potential. *Cell Calcium*, **19**, 113–123.
- Doupe, A.J., Landis, S.C. & Patterson, P.H. (1985) Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci.*, **5**, 2119–2142.
- Friel, D.D. & Tsien, R.W. (1992a) Phase-dependent contributions from Ca²⁺ entry and Ca²⁺ release to caffeine-induced [Ca²⁺]_i oscillations in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*, **8**, 1109–1125.
- Friel, D.D. & Tsien, R.W. (1992b) A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ store in bullfrog sympathetic neurons modulates effects of Ca²⁺ entry on [Ca²⁺]_i. *J. Physiol. (Lond.)*, **450**, 217–246.
- Furuichi, T., Furutama, D., Hakamata, Y., Nakai, J., Takeshima, H. & Mikoshiba, K. (1994b) Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J. Neurosci.*, **14**, 4794–4805.
- Furuichi, T., Kohda, K., Miyawaki, A. & Mikoshiba, K. (1994a) Intracellular channels. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **4**, 294–303.
- Gandía, L., Borges, R., Albillos, A. & García, A.G. (1995) Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflügers Arch.*, **430**, 55–63.
- Hernández-Cruz, A., Díaz-Muñoz, M., Gómez-Chavarrín, M., Cañedo-Merino, R., Protti, D.A., Escobar, A.L., Sierralta, J. & Suárez-Isla, B.A. (1995) Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced Ca²⁺ mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **7**, 1684–1699.
- Hernández-Cruz, A., Escobar, A.L. & Jiménez, N. (1997) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca²⁺. *J. Gen. Physiol.*, **109**, 147–167.
- Hernández-Cruz, A., Sala, F. & Adams, P.R. (1990) Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science*, **247**, 858–862.
- Holliday, J., Adams, R.J., Sejnowski, T.J. & Spitzer, N.C. (1991) Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons. *Neuron*, **7**, 787–796.
- Hondermarck, H., McLaughlin, C.S., Patterson, S.D. & Bradshaw, R.A. (1994) Early changes in protein synthesis induced by basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, and epidermal growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9377–9381.
- Islas-Suárez, L., Gómez-Chavarrín, M., Drucker-Colín, R. & Hernández-Cruz, A. (1994) Properties of the sodium current in rat chromaffin cells exposed to nerve growth factor *in vitro*. *J. Neurophysiol.*, **72**, 1938–1948.
- Itoh, T., Niwa, H., Nagamatsu, M., Mitsuma, T., Miyakawa, A., Pleasure, D. & Sobue, G. (1998) Nerve growth factor maintains regulation of intracellular calcium in neonatal sympathetic neurons but not in mature or aged neurons. *Neuroscience*, **82**, 641–651.
- Jia, M., Li, M., Liu, X.W., Jiang, H., Nelson, P.G. & Guroff, G. (1999) Voltage-sensitive calcium currents are acutely increased by nerve growth factor in PC12 cells. *J. Neurophysiol.*, **82**, 2847–2852.
- Jiang, H., Takeda, K., Lazarovici, P., Katagiri, Y., Yu, Z.X., Dickens, G., Chabuk, A., Liu, X.W., Ferrans, V. & Guroff, G. (1999) Nerve growth factor (NGF)-induced calcium influx and intracellular calcium mobilization in 3T3 cells expressing NGF receptors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 26209–26216.
- Jiménez, N. & Hernández-Cruz, A. (1998) Rat chromaffin cells display dramatic changes in calcium dynamics and homeostasis consistent with the acquisition of a neuronal phenotype after NGF treatment. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **24**, p. 82.
- Koike, T. & Tanaka, S. (1991) Evidence that nerve growth factor dependence of sympathetic neurons for survival *in vitro* may be determined by levels of cytoplasmic free Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3892–3896.
- Kostyuk, P. & Verkhratsky, A. (1994) Calcium stores in neurons and glia. *Neuroscience*, **63**, 381–404.
- Kuba, K. (1994) Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in neurons. *Jpn. J. Physiol.*, **44**, 613–650.
- Kuwajima, G., Futatsugi, A., Niinobe, M., Nakanishi, S. & Mikoshiba, K. (1992) Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron*, **9**, 1133–1142.
- Lai, F.A., Dent, M., Wickenden, C., Xu, L., Kumari, G., Misra, M., Lee, H.B., Sar, M. & Meissner, G. (1992) Expression of a cardiac Ca²⁺-release channel isoform in mammalian brain. *Biochem. J.*, **288**, 553–564.
- Malgaroli, A., Fesce, R. & Meldolesi, J. (1990) Spontaneous [Ca²⁺]_i fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5-trisphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ store. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3005–3008.
- Malgaroli, A. & Meldolesi, J. (1991) [Ca²⁺]_i oscillations from internal stores sustain exocytic secretion from the chromaffin cells of the rat. *FEBS Lett.*, **283**, 169–172.
- Mhyre, T.R., Maine, D.N. & Holliday, J. (2000) Calcium-induced calcium release from intracellular stores is developmentally regulated in primary cultures of cerebellar granule neurons. *J. Neurobiol.*, **42**, 137–147.
- Morgado-Valle, C., Verdugo-Díaz, L., García, D.E., Morales-Orozco, C. & Drucker-Colín, R. (1998) The role of voltage-gated Ca²⁺ channels in neurite growth of cultured chromaffin cells induced by extremely low frequency (ELF) magnetic field stimulation. *Cell Tissue Res.*, **291**, 217–230.
- Morimoto, M., Morita, N. & Kawate, M. (1994) The effects of NGF and glucocorticoid on the cytological features of rat chromaffin cells *in vitro*. *Neuroreport*, **5**, 954–956.
- Neher, E. & Augustine, G.J. (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **450**, 273–301.
- Nohmi, M., Hua, S.-Y. & Kuba, K. (1992a) Basal Ca²⁺ and the oscillation of Ca²⁺ in caffeine-treated bullfrog sympathetic neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, **450**, 513–528.
- Nohmi, M., Hua, S.-Y. & Kuba, K. (1992b) Intracellular calcium dynamics in response to action potentials in bullfrog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **458**, 171–190.
- O'Sullivan, A.J., Cheek, T.R., Moreton, R.B., Berridge, M.J. & Burgoyne, R.D. (1989) Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *Eur. Mol. Biol. Org. J.*, **8**, 401–411.
- Orkand, R.K. & Thomas, R.C. (1995) Effects of low doses of caffeine on [Ca²⁺]_i in voltage-clamped snail (*Helix aspersa*) neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, **489**, 19–28.
- Park, Y.B., Herrington, J., Babcock, D.F. & Hille, B. (1996) Ca²⁺ clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **492**, 329–346.
- Patterson, P.H. (1990) Control of cell fate in a vertebrate neurogenic lineage. *Cell*, **62**, 1035–1038.
- Pitchford, S., De Moor, K. & Glaeser, B.S. (1995) Nerve growth factor stimulates rapid metabolic responses in PC12 cells. *Am. J. Physiol.*, **268**, C936–C943.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P. & Meldolesi, J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.*, **74**, 595–636.
- Seeley, P.J. & Greene, L.A. (1983) Short-latency local actions of nerve growth factor at the growth cone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2789–2793.

- Song, L.S., Sham, J.S., Stern, M.D., Lakatta, E.G. & Cheng, H. (1998) Direct measurement of SR release flux by tracking 'Ca²⁺ spikes' in rat cardiac myocytes. *J. Physiol. (Lond.)*, **512**, 677–691.
- Spitzer, N.C. (1994) Calcium and gene expression. *Prog. Brain Res.*, **103**, 123–126.
- Stern, M.D. (1992) Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys. J.*, **63**, 497–517.
- Thayer, S.A., Hirning, L.D. & Miller, R.J. (1988) The role of caffeine-sensitive calcium stores in the regulation of intracellular free calcium concentration in rat sympathetic neurons *in vitro*. *Mol. Pharmacol.*, **34**, 664–673.
- Tischler, A., Riseberg, J.C., Hardenbrook, M.A. & Cherington, V. (1993) Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult chromaffin cells *in vitro*. *J. Neurosci.*, **13**, 1533–1542.
- Unsicker, K., Krisch, B., Otten, U. & Thoenen, H. (1978) Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells. Impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3498–3502.
- Usachev, Y., Shmigol, N., Pronchok, N., Kostyuk, P. & Verkhatsky, A. (1993) Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*, **57**, 845–859.
- Usachev, Y.M. & Thayer, S.A. (1999) Controlling the urge for a Ca²⁺ surge: all or none Ca²⁺ release in neurons. *Bioessays*, **21**, 743–750.
- Utzschneider, D.A., Rand, M.N., Waxman, S.G. & Kocsis, J.D. (1994) Nuclear and cytoplasmic Ca²⁺ signals in developing rat dorsal root ganglion neurons studied in excised tissue. *Brain Res.*, **635**, 231–237.
- Verkhatsky, A. & Shmigol, A. (1996) Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium*, **19**, 1–14.

ANEXO II – ARTÍCULO

Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release Phenomena in Mammalian Sympathetic Neurons Are Critically Dependent on the Rate of Rise of Trigger Ca²⁺.

Arturo Hernández-Cruz, Ariel L. Escobar, and Nicolás Jiménez.
Journal of General Physiology. 1997, Vol. 109, pp. 147–167.

Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release Phenomena in Mammalian Sympathetic Neurons Are Critically Dependent on the Rate of Rise of Trigger Ca²⁺

ARTURO HERNÁNDEZ-CRUZ,* ARIEL L. ESCOBAR,† and NICOLÁS JIMÉNEZ*

From the *Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria México City, D.F. 04510, México; and †Centro de Biofísica y Bioquímica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana Km 11, Altos de Pipe, Venezuela

ABSTRACT The role of ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ stores present in nonmuscular cells is not yet completely understood. Here we examine the physiological parameters determining the dynamics of caffeine-induced Ca²⁺ release in individual fura-2-loaded sympathetic neurons. Two ryanodine-sensitive release components were distinguished: an early, transient release (TR) and a delayed, persistent release (PR). The TR component shows refractoriness, depends on the filling status of the store, and requires caffeine concentrations ≥ 10 mM. Furthermore, it is selectively suppressed by tetracaine and intracellular BAPTA, which interfere with Ca²⁺-mediated feedback loops, suggesting that it constitutes a Ca²⁺-induced Ca²⁺-release phenomenon. The dynamics of release is markedly affected when Sr²⁺ substitutes for Ca²⁺, indicating that Sr²⁺ release may operate with lower feedback gain than Ca²⁺ release. Our data indicate that when the initial release occurs at an adequately fast rate, Ca²⁺ triggers further release, producing a regenerative response, which is interrupted by depletion of releasable Ca²⁺ and Ca²⁺-dependent inactivation. A compartmentalized linear diffusion model can reproduce caffeine responses: When the Ca²⁺ reservoir is full, the rapid initial Ca²⁺ rise determines a faster occupation of the ryanodine receptor Ca²⁺ activation site giving rise to a regenerative release. With the store only partially loaded, the slower initial Ca²⁺ rise allows the inactivating site of the release channel to become occupied nearly as quickly as the activating site, thereby suppressing the initial fast release. The PR component is less dependent on the store's Ca²⁺ content. This study suggests that transmembrane Ca²⁺ influx in rat sympathetic neurons does not evoke widespread amplification by CICR because of its inability to raise [Ca²⁺] near the Ca²⁺ release channels sufficiently fast to overcome their Ca²⁺-dependent inactivation. Conversely, caffeine-induced Ca²⁺ release can undergo considerable amplification especially when Ca²⁺ stores are full. We propose that the primary function of ryanodine-sensitive stores in neurons and perhaps in other nonmuscular cells, is to emphasize subcellular Ca²⁺ gradients resulting from agonist-induced intracellular release. The amplification gain is dependent both on the agonist concentration and on the filling status of intracellular Ca²⁺ stores.

KEY WORDS: CICR • fura-2 • ryanodine • calcium release • calcium signaling

INTRODUCTION

Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR)¹ is crucial for excitation-contraction coupling in mammalian cardiac muscle. According to a widely accepted scheme, the initial depolarization of the sarcolemmal membrane triggers Ca²⁺ influx by opening voltage-gated Ca²⁺ channels. This Ca²⁺ influx activates ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels (RyR) on the sarcoplasmic reticulum,

Address correspondence to Arturo Hernández-Cruz, Ph.D., Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, P.O. Box: 70-253, México city, D.F. 04510, México. Fax: 525-622-56-07; E-mail: ahernan@ifcsun1.fisiol.unam.mx

¹Abbreviations used in this paper: BAPTA, 1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-NNN'-tetraacetic acid; C-Ca²⁺ transient, Ca²⁺ transient elicited by caffeine application; CICR, Ca²⁺-induced Ca²⁺ release; ER, endoplasmic reticulum; K⁺-Ca²⁺ transient, Ca²⁺ transient initiated by depolarization with a high K⁺ solution; PR, persistent component of caffeine-induced Ca²⁺ release; RyR, ryanodine receptor; SR, sarcoplasmic reticulum; TR, transient component of caffeine-induced Ca²⁺ release; τ_d , time constant of decay; τ_{dPR} , time constant of decay of PR component; τ_{dTR} , time constant of decay of TR component.

from which Ca²⁺ is then released into the cytosol, producing the large Ca²⁺ transients required to initiate contraction (Wier, 1990). Experiments in rat cardiac myocytes have shown that voltage-gated Ca²⁺ influx is the most efficient stimulus to trigger Ca²⁺ release (Sham et al., 1995). A recent model proposes that single L-type Ca²⁺ channels in the membrane of t-tubules are functionally coupled and in close proximity to small clusters or RyRs in the sarcoplasmic reticulum, which together constitute a Ca²⁺ release unit (Stern, 1992; Cannell et al., 1995).

The molecular elements responsible for CICR (voltage-gated Ca²⁺ channels and ryanodine receptor channels) are also present in vertebrate neurons (reviewed by Kostyuk and Verkhratsky, 1994; Kuba, 1994; Verkhratsky and Shmigol, 1996). This leads to the notion that Ca²⁺ mobilization from intracellular stores mediated by RyR channels may constitute an important pathway for Ca²⁺ signaling (McPherson and Campbell, 1993). Nonetheless, several studies indicate that under physiological conditions, neuronal calcium transients originated by

Ca²⁺ influx are not amplified to a large extent by CICR. In the best cases, only a modest augmentation and prolongation of the calcium transient over that which would be produced by the calcium influx alone has been observed (Thayer et al., 1988; Friel and Tsien, 1992; Nohmi et al., 1992; Thayer and Miller, 1990; Ivanenko et al., 1993; Usachev et al., 1993; Kostyuk and Verkhatsky, 1994; Kuba, 1994; Shmigol et al., 1995). Moreover, prolonged depolarizations are often needed to raise [Ca²⁺] enough to initiate CICR (Llano et al., 1994; Verkhatsky and Shmigol, 1996). This behavior is characteristic of low feedback loop gain models of CICR (Stern, 1992).

If nerve cells are not optimized for widespread amplification of Ca²⁺ transients resulting from voltage-gated Ca²⁺ influx, what is the role of their ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores? The answer to this question requires a better understanding of the functional organization of ryanodine receptors and neuronal caffeine-sensitive stores. For instance, we need to establish if released Ca²⁺, by interacting with regulatory sites on the RyR channel, can participate in feedback loops that may promote or prevent further release. A related question is whether or not neighboring Ca²⁺ release channels and calcium stores are diffusively coupled. Finally, we need to discern to what extent calcium depletion of intracellular reservoirs control the release process.

The goal of this study was to analyze the mechanisms that determine the dynamics of Ca²⁺ release from ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons after its activation by a rapid caffeine application. Since it is likely that endogenous agonists act similarly to caffeine (Hua et al., 1994), the conclusions of our study should be applicable to Ca²⁺ release initiated by physiological phenomena as well (Pozzan et al., 1994).

This paper presents unequivocal evidence of CICR phenomena when trigger Ca²⁺ is released at an adequately fast rate from intracellular stores. Our data also suggest that the regenerative release is interrupted by a combination of rapid depletion of releasable Ca²⁺ and Ca²⁺-dependent inactivation of release. The most salient features of caffeine-induced Ca²⁺ mobilization described in this paper could be accounted for with a compartmentalized linear diffusion model which contains a caffeine-sensitive intracellular Ca²⁺ store capable of releasing Ca²⁺ in response to changes in cytosolic [Ca²⁺], separated from the plasma membrane by a diffusional space containing fixed Ca²⁺ buffers.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Culture of Rat Sympathetic Neurons

Cultures of superior cervical ganglion neurons were prepared as follows: 10-d-old rats of either sex were used. Ganglia were re-

moved under ether anesthesia and aseptically conditions. They were cleaned and chopped, and then incubated in Ca²⁺ and Mg²⁺-free Hank's medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) with 1 mg/ml trypsin (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ) and 2 mg/ml DNase I (Sigma Chemical Co.) for 30 min at 37°C. After digestion, trypsin was inactivated by dilution in DMEM medium (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) containing 10% FCS and 1 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co.). The tissue was then incubated in Hank's medium with 2 mg/ml collagenase (Worthington Biochemical Corp.) and 2 mg/ml DNase I for 30 min at 37°C. Tissue fragments were then triturated with a fire-polished siliconized Pasteur pipette. Cell suspension was centrifuged at 800 rpm for 10 min, washed twice in Hank's medium (Gibco BRL) and resuspended in fresh DMEM (Gibco BRL) supplemented with 10% FCS (Gibco BRL). Cells were seeded on polylysine-treated No. 1 glass coverslips (1 × 10⁵ cells per well) and maintained for up to 3 wk supplemented with 20 ng/ml of 7S nerve growth factor (Sigma) at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Medium was changed three times per week. Most experiments were carried out with cells that had been in culture from 1 to 5 d.

Measurements of Intracellular Ca²⁺ and Sr²⁺ Concentrations

Methods are described in detail elsewhere (Hernández-Cruz et al., 1995). Briefly, a coverslip containing sympathetic neurons was transferred to a recording chamber (Mod. RC-25; Warner Instruments, Hamden, CT) on an inverted microscope (Nikon Diaphot TMD; Nikon Corp., Tokyo, Japan). Cells were loaded with fura-2 by incubation with the acetoxymethyl (AM) ester form of the dye (fura-2/AM; Molecular Probes, Eugene, OR), at a final concentration of 1 μM, with no dispersing agents added. Cells were allowed to load for 30–45 min at room temperature and then rinsed continuously for another 15 min before the beginning of the experiments.

Ca²⁺ or Sr²⁺ levels were determined by recording pairs of images using alternating illumination with 340- and 380-nm excitation. Dual wavelength excitation was provided by two nitrogen pulsed lasers (3-ns pulse duration), one emitting at its natural wavelength of 337 nm and the second one dye-tuned at 380 nm. These lasers were triggered alternatively at frequencies ranging from 2 to 15 Hz under computer control. (Biolase Imaging System, Newton MA). Background images at 340- and 380-nm illumination were obtained from an area of the coverslip free of cells. These images were stored separately and used for on-line background subtraction. We found that a correction for cell autofluorescence was not essential for calibration purposes. The key elements of the fluorescence Ca²⁺ imaging system were a high numerical aperture UV objective (Nikon UV-F 100X, 1.3 N.A.), an intensified charge coupled device camera (c2400-87; Hamamatsu, Bridgewater, NJ), and the Biolase Imaging System running under their FL-2 software. The system allows real-time simultaneous acquisition of fluorescence measurements from multiple areas of interest placed on individual cells or within a single cell. All Ca²⁺ determinations in this study were obtained from entire cells. Ca²⁺ or Sr²⁺ concentrations were calculated from fluorescence measurements at 340- and 380-nm excitation wavelengths using the formula:

$$[X^{2+}] = K_D (F_i/F_b) (R - R_{\min}) / (R_{\max}/R),$$

where the calculated dissociation constant (K_D) for fura-2 is 300 nM for Ca²⁺ and 7.6 μM for Sr²⁺ (Kwan and Putney, 1990), F_i/F_b is the ratio of fluorescence values for X²⁺-free/X²⁺-bound indicator at 380-nm excitation, R is the ratio of fluorescence at 340/380 nm for the unknown [X²⁺], and R_{\min} , R_{\max} are the ratio of fura-2 fluorescences at 340/380 nm of X²⁺-free and X²⁺-bound fura-2.

The values of F_i/F_b , R_{\min} , and R_{\max} for Ca^{2+} were determined by measuring under identical conditions the fluorescence of a glass capillary 100- μm in diameter containing calibration solutions with 50–100 μM fura-2 (pentapotassium salt; Molecular Probes) and known Ca^{2+} concentrations in the range from 10 nM to 40 μM . Sr^{2+} values were determined similarly, using solutions containing 100 μM fura-2 and either no added Sr^{2+} or 1 mM Sr^{2+} . Although in situ calibrations were attempted in initial experiments, we found it very difficult to manipulate $[\text{Ca}^{2+}]$ over the required range. Our Ca^{2+} and Sr^{2+} measurements, based exclusively on the in vitro calibrations could be underestimated to some extent because of effects of viscosity and dye binding to cytoplasmic constituents (Konishi et al., 1988). In previous experiments, we estimated that fura-2 reached intracellular concentrations between 30 and 50 μM . This was done by comparing fluorescence levels attained in similar cells 10 min after breaking-in with patch pipettes filled with known concentrations of fura-2 pentapotassium (range 25–100 μM). By comparing responses from cells loaded with fura-2 for 30–45 min with those from cells loaded with much less fura-2 (10-min incubation), we concluded that the additional Ca^{2+} buffer activity introduced by the dye did not affect significantly the magnitude or the time course of Ca^{2+} transients (unpublished data).

Solutions

Cells were continuously superfused with a recording solution containing (in mM) NaCl 130, KCl 3, CaCl_2 2, MgCl_2 2, NaHCO_3 1, NaH_2PO_4 0.5, HEPES-Na 5, and glucose 5, pH 7.4. In some experiments CaCl_2 was replaced equimolarly by SrCl_2 . Test solutions were pressure-applied (10 psi) via independent puffer pipettes located within 100 μm from the cell under examination. In some experiments, drugs (ryanodine, tetracaine, and the acetoxyethyl ester of 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*NNN'*-*N'*-tetraacetic acid [BAPTA-AM]) were applied via a third puffer pipette. Application of test solutions and drugs were separately controlled by solenoid valves of two Picospritzer II devices (General Valve, Fairfield, NJ) governed by an 486/AT computer running pClamp 5.1 (Axon Instruments, Foster City, CA). Control experiments showed that with this procedure, the external medium surrounding the cell is replaced within <100 ms. Most experiments were conducted in cells that had been kept in culture from 1 to 4 d. Experiments were carried out at 22–23°C. Test solutions used were: caffeine 10 or 20 mM, or tetracaine 500 μM , dissolved in normal saline, and a depolarizing solution containing 140 mM KCl, 10 mM HEPES-Na and either 10 mM CaCl_2 or 10 mM SrCl_2 .

Sr^{2+} Replacement Procedure

To substitute Sr^{2+} for Ca^{2+} both externally and internally, a coverslip containing sympathetic neurons was extensively superfused (45 min or longer) with normal external solution containing no Ca^{2+} (no Ca^{2+} added plus 500 μM EGTA) and 2 mM SrCl_2 . During this period, the dish was exposed three times (1-min duration each) to a Sr^{2+} -containing depolarizing solution (140 mM KCl, 2 mM SrCl_2 , 10 mM HEPES-Na, pH 7.35). In addition, to promote substitution of Ca^{2+} with Sr^{2+} in the intracellular stores, cells were bathed three times with saline containing 2 mM Sr^{2+} and 10 mM caffeine (1-min duration each at 10-min intervals). The Sr^{2+} replacement procedure had been completed before the beginning of fluorescence measurements.

Mathematical Modeling of Ca^{2+} Mobilization from Intracellular Stores in Rat Sympathetic Neurons

The model consists of a linear arrangement representing the extracellular space, as well as the cytosol and the endoplasmic retic-

ulum (ER), with boundary conditions located both at the plasma and at the ER membranes. The ER and the plasma membrane are coupled via n diffusional compartments. In the model, Ca^{2+} diffuses freely between compartments and binds to fixed Ca^{2+} buffers. Ca^{2+} fluxes due to diffusion exchange with neighboring compartments and binding-unbinding to fixed buffers were computed by integrating Fick's law difference equations and mass action law differential equations, respectively. The boundary condition representing the plasma membrane allows Ca^{2+} influx through voltage-gated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} extrusion via Ca^{2+} pumps. Similar Ca^{2+} pumps are located at the boundary condition representing the membrane of the ER compartment, which also contains RyR channels which allow Ca^{2+} release into the cytosol. These channels are regulated by two different cytosolic Ca^{2+} binding sites operating with a first order kinetic scheme, which control activation and inactivation of the channel, respectively, and a luminal regulatory binding site which controls channel conductance. The degree of activation or inactivation of this pathway is proportional to the fraction of total sites that are occupied with Ca^{2+} . Caffeine-induced stimulation of RyRs was simulated by an abrupt change in the on-rate for Ca^{2+} binding to the activation sites, with all remaining rate constants unaltered. A more detailed description of the model is included as an appendix.

RESULTS

Rationale of Caffeine-induced Ca^{2+} Release Experiments

Our basic experimental design allows the controlled activation of calcium influx through voltage-gated Ca^{2+} channels and Ca^{2+} release from intracellular stores in intact fura-2-loaded neurons (see Hernández-Cruz et al., 1995). Caffeine application provides two main advantages to analyze CICR phenomena in nerve cells with respect to voltage-gated Ca^{2+} influx. First, since Ca^{2+} is directly released from intracellular stores, $[\text{Ca}^{2+}]$ in the microenvironment surrounding RyRs increases at a faster rate than when Ca^{2+} diffuses from distant sources (i.e., the plasma membrane). Secondly, by increasing Ca^{2+} affinity for the RyRs activation sites, caffeine promotes CICR (Sitsapesan and Williams, 1990). At the concentration used in these experiments (10 mM), caffeine produces half-maximal activation of release (Akaike and Sadoshima, 1989; Uneyama et al., 1993). This allows both up- and down-regulation of release by $[\text{Ca}^{2+}]$ and other modulators (Hernández-Cruz et al., 1995). Previous work has shown that externally applied caffeine enters readily into cells, reaching equilibrium with extracellular concentration in <0.2 s (Hernández-Cruz et al., 1990; O'Neill et al., 1990; Kuba et al., 1990). Thus, the amount of Ca^{2+} released will depend on three governing factors: (a) the prevalent cytosolic Ca^{2+} concentration, (b) the number of RyRs opened per time unit by the drug, and (c) the calcium content of the store (Friel and Tsien, 1992; Hernández-Cruz et al., 1995; Shmigol et al., 1996). Changes of cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$ resulting from Ca^{2+} fluxes through the ER membrane can directly enhance (or inhibit) further release by interacting with regulatory Ca^{2+} -binding sites

on the RyR channels (Bezprozvanny et al., 1991; Györke and Patade, 1994; Meissner, 1994).

Two Kinetic Components of Caffeine-induced Ca^{2+} Release

Fig. 1 A depicts Ca^{2+} transients recorded from a fura-2-loaded sympathetic neuron in response to three brief applications of a high- K^+ solution (arrows; see MATERIALS AND METHODS), followed by several caffeine applications (10 mM, 40 s). Ca^{2+} transients elicited by high- K^+ and caffeine are termed here K^+ - and C- Ca^{2+} transients, respectively. Conditioning high- K^+ pulses were applied to replete Ca^{2+} stores before the first use of caffeine. Notice that the first Ca^{2+} release comprises an early, fast release that decays before the end of the pulse, (transient release component, TR), followed by a slower and more sustained release (persisting release component, PR). When caffeine was applied again 140 s later, the TR component was obliterated, and only the PR component remained. Subsequent caffeine applications only produced smaller PRs with slower onsets. Fig. 1 B, obtained from a similar experiment, shows superimposed responses to the first and second caffeine applications. Both responses initiated with similar latencies, but the second one had a slower rate of rise and did not bring about a TR component. The first derivatives of these $[Ca^{2+}]$ records are shown in the inset (Fig. 1 C). Notice that during the second caffeine response the initial rate of rise was about half of that observed during the first response. The mean amplitudes of TR and PR components of release, measured shortly after the last conditioning high K^+ pulse in 38 cells was TR = $1,684.6 \pm 140$ nM; PR = 326.8 ± 9.6 nM (mean \pm SE).

When exposed to caffeine for the first time, many cells show TR and PR components, even in the absence of conditioning high K^+ applications (see Fig. 5). The TR component recuperates if caffeine is applied again 10–15 min later (data not shown). This slow recovery is greatly speeded up if one or more conditioning K^+ - Ca^{2+} transients are elicited during the interval between caffeine applications. This behavior is consistent with a use-dependent depletion of a slowly replenished caffeine-sensitive Ca^{2+} store (Thayer et al., 1988; Friel and Tsien, 1992; Usachev et al., 1993).

Both Kinetic Components of Caffeine-induced Ca^{2+} Mobilization Result from Intracellular Ca^{2+} Release

It has been reported that caffeine can directly inhibit K^+ currents in sympathetic neurons (Akaike and Sadoshima, 1989; Dryer et al., 1995). Therefore C- Ca^{2+} transients could result in part from membrane depolarization as well as intracellular Ca^{2+} release. It also has been shown that caffeine can directly activate Ca^{2+} permeable channels in smooth muscle cells (Guerrero et al., 1994). The most rigorous test to rule out these po-

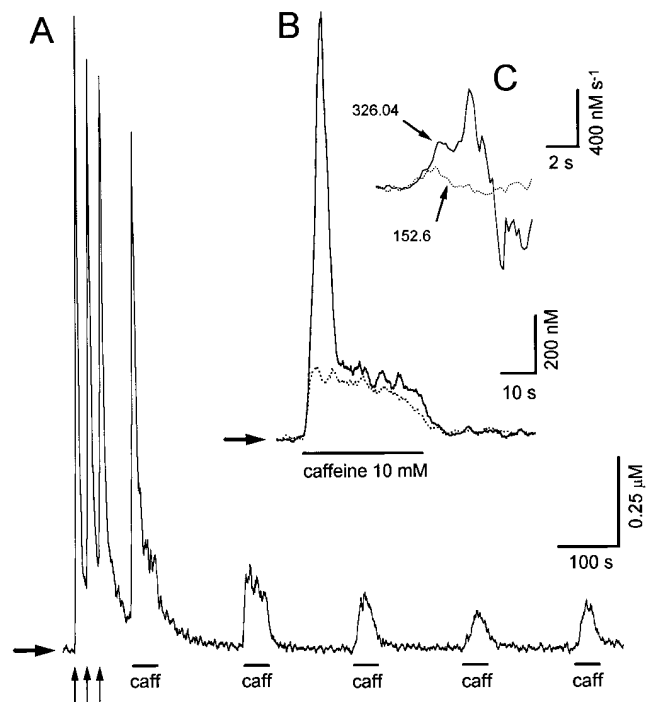


FIGURE 1. (A) Ca^{2+} transients recorded from a fura-2-loaded sympathetic neuron in response to three applications (500 ms each) of a solution containing high K^+ and 10 mM Ca^{2+} (vertical arrows; see MATERIALS AND METHODS) and then to five applications of 10 mM caffeine (40 s each) at intervals of 140 s. Notice that only the first caffeine-induced Ca^{2+} release showed a transient release (TR) followed by a persistent release (PR) component. (B) Comparison, in a different cell, of the kinetics of intracellular Ca^{2+} release elicited by the first (continuous line) and the second (dotted line) caffeine applications. Only the PR component is elicited by the second application. (C) First derivatives of the upstroke of the $[Ca^{2+}]$ signals shown in B. Numbers next to traces indicate the initial rate of rise. Horizontal arrows indicate resting $[Ca^{2+}]$.

tential problems would be to prevent completely and selectively Ca^{2+} release from caffeine-sensitive stores. The plant alkaloid ryanodine is the most specific Ca^{2+} release blocker known. Nevertheless, when ryanodine locks the release channel in a subconducting state (Russeau et al., 1987), it can significantly deplete Ca^{2+} stores, hence increasing intracellular Ca^{2+} levels by reducing the capacity of the cell to remove calcium (Kuba, 1994). This effect is most apparent when ryanodine (10–20 μ M) is applied continuously (see Fig. 8). In preliminary experiments we noticed that 20 μ M of ryanodine can inhibit completely and irreversibly intracellular release after applications as brief as 5 s, without seriously affecting calcium homeostasis. Fig. 2 A shows the use-dependent inhibition of caffeine responses 1 and 4 min after a ryanodine application 5 s in duration. Fig. 2, B and C, depict the first derivatives of selected segments of these $[Ca^{2+}]$ records. Ryanodine treatment did not change significantly basal Ca^{2+} levels (Fig. 2 A),

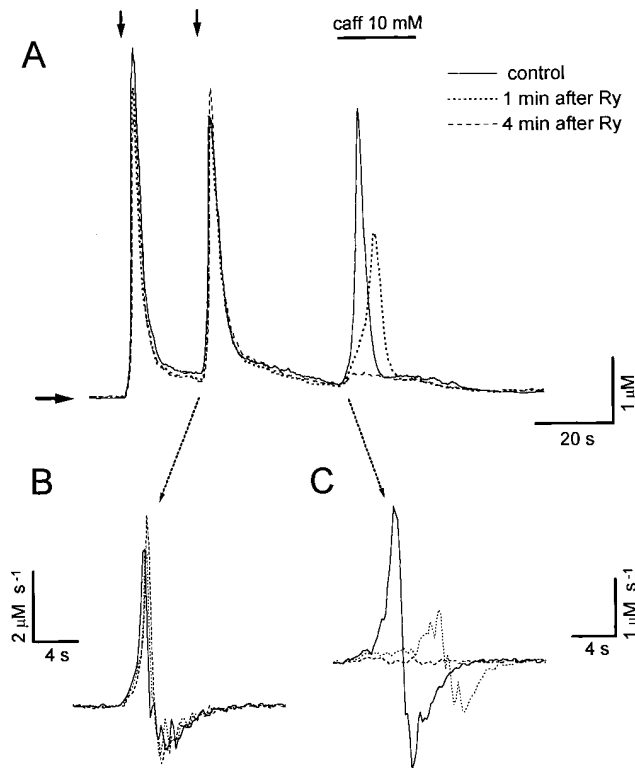


FIGURE 2. Use-dependent ryanodine inhibition of caffeine-induced Ca^{2+} release. (A) Ca^{2+} transients elicited in a sympathetic neuron following the applications of high- K^{+} for 0.5 s (vertical arrows) and 10 mM caffeine for 20 s (horizontal bar). Traces shown were obtained before (continuous trace) and after 1 or 4 min (dotted and dashed traces, respectively) of a single application of 20 μM ryanodine for 5 s with a third puffer pipette. (B) First derivatives of the K^{+} - Ca^{2+} transients indicated. The magnitude and kinetics of these Ca^{2+} transients were not significantly affected by ryanodine. (C) First derivatives of caffeine responses. The rate of rise fell from 2.8 $\mu\text{M s}^{-1}$ before to 0.74 and 0.08 $\mu\text{M s}^{-1}$ after 1 and 4 min of ryanodine application. Caffeine responses were completely abolished 10 min after ryanodine application (not shown). Horizontal arrow indicate resting $[\text{Ca}^{2+}]$.

or the magnitude or kinetics of the K^{+} - Ca^{2+} transients. The time constant of an exponential function fitted to the decay phase of the K^{+} - Ca^{2+} transients remained between 2.1 and 2.3 s. Also, the peak rate of rise (7.8 $\mu\text{M s}^{-1}$ in the control response), diminished only slightly after 1 and 4 min of exposure to the drug (7.1 and 6.4 $\mu\text{M s}^{-1}$, respectively). Nevertheless, the amplitude and rate of rise of the Ca^{2+} transients dropped from 2.8 $\mu\text{M s}^{-1}$ to 0.74 and 0.08 $\mu\text{M s}^{-1}$ after 1 and 4 min of ryanodine exposure (Fig. 2 C). Note that at 1 min post ryanodine, caffeine elicits a delayed and partially inhibited TR component, whereas only a reduced PR persists after 4 min. 10 min after ryanodine application, caffeine responses were completely abolished, both in this cell and in five other cells similarly examined (data not shown). Three conclusions can be drawn from these re-

sults: (a) brief ryanodine applications can block Ca^{2+} release without affecting resting Ca^{2+} levels or the kinetics of K^{+} - Ca^{2+} transients, (b) both kinetic components of the caffeine induced- Ca^{2+} mobilization result entirely from intracellular Ca^{2+} release, and (c) the TR component appears more susceptible to use-dependent inhibition of release by ryanodine than the PR component.²

The Effects of Caffeine Pretreatment on the Kinetic Behavior of Subsequent Responses Are Not Due to Caffeine Desensitization

A conceivable explanation for the effects of caffeine pretreatment on the kinetic behavior of subsequent responses is that it produces a desensitization of Ca^{2+} stores that persist for several minutes after the agonist is removed. To explore this possibility, the effect of pretreating the cell with a brief conditioning caffeine application on a test response was examined. To distinguish between the effects of caffeine per se from those resulting from depletion of the Ca^{2+} store, we took advantage of the Ca^{2+} -induced inhibition of Ca^{2+} release characteristic of these cells (Hernández-Cruz et al., 1995). Conditioning caffeine applications were initiated at different intervals from a standard K^{+} - Ca^{2+} transient. Caffeine, applied at intervals shorter than 10 s (when $[\text{Ca}^{2+}]$ is still relatively high), is ineffective at releasing Ca^{2+} . When this interval is increased, caffeine becomes progressively more effective. Fig. 3 A shows that when the conditioning caffeine application does not release any Ca^{2+} , a test caffeine response 90 s later displays both TR and PR components (continuous trace). The same is true when only a small Ca^{2+} release occurs during the conditioning caffeine application (dashed trace). However, when the conditioning caffeine application brings about a substantial Ca^{2+} release, the TR component of the succeeding test response is completely abolished (dotted trace). This experiment rules out desensitization of the release, and clearly establishes that the diminution of the TR component during the second caffeine application only occurs if the first application produces substantial opening of Ca^{2+} -release channels and/or Ca^{2+} efflux from the intracellular stores. This inference is further supported by experiments shown in Fig. 3, B and C. First, two identical applications of 10 mM caffeine were given at an interval of 2 min (continuous traces, Fig. 3 B and C). The second response shown in Fig. 3 C displays the usual inhibition of the TR component. The experiment was then re-

²In recent experiments, we found that the fluorescent ryanodine derivative BODIPY[®] FL-X ryanodine (1 μM ; Molecular Probes), produces a use-dependent, partial inhibition of caffeine-induced Ca^{2+} transients and the abolition of the TR component (González, C., and A. Hernández-Cruz. 1996).

peated, but now the second response was elicited by delivering 20-mM caffeine with a third pipette, instead of 10 mM (*dotted trace*). This experiment was designed to try to activate more efficiently desensitized Ca^{2+} stores with a higher dose of caffeine. Although the second response elicited with 20 mM caffeine was slightly larger (Fig. 3 C, *arrow*) and had a faster rate of rise (Fig. 3 C, *inset*), it was still unable to trigger a complete TR response. Similar results were obtained in experiments

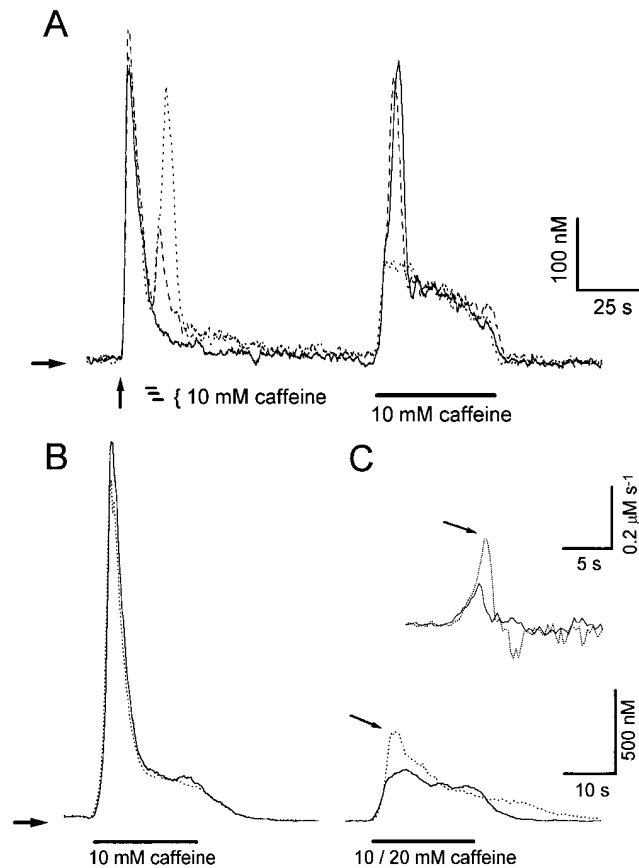


FIGURE 3. Obliteration of the TR component is not due to caffeine desensitization. (A) Caffeine 10 mM (5 s) applied at different intervals from a high K^+ -initiated Ca^{2+} transient evokes different amounts of Ca^{2+} release. When caffeine application does not release any Ca^{2+} (*continuous trace*), or releases only a small amount (*dashed trace*), a test caffeine response 90 s later displays both TR and PR components. When the conditioning caffeine application brings about a substantial Ca^{2+} release (*dotted trace*), the transient component of the succeeding test response is abolished. (B and C) Two applications of 10 mM caffeine were given at an interval of 2 min. The first response shows transient and sustained components (B, *continuous trace*), while the second response displays the usual inhibition of the transient component (C, *continuous trace*). The experiment was repeated, but now the second response was elicited by delivering 20 mM caffeine with a third pipette (B and C, *dotted traces*). Notice that caffeine, even at this higher concentration, was unable to trigger a TR component during the second response (*arrows*). (*Inset*) Comparison of the first derivatives of traces shown in C. Horizontal arrows indicate resting $[\text{Ca}^{2+}]$.

where even higher caffeine concentrations (i.e., 40 mM) were used to elicit the second response (data not shown).

The Kinetic Behavior of Caffeine-induced Ca^{2+} Release Depends upon the Filling Status of Intracellular Stores

As mentioned above, the obliteration of the TR component during subsequent applications of caffeine is a consequence of the opening of Ca^{2+} release channels and/or Ca^{2+} liberation from internal stores during the first application. Experiments were conducted to try to decide between these possibilities. We compared the kinetics of release under conditions where presumably an equal number of release channels were opened, but with the Ca^{2+} store filled up to different degrees. Fig. 4 A shows the gradual recovery of the TR component after the application of one to four small “filler” conditioning K^+ - Ca^{2+} transients. Fig. 4 B depicts the first derivative of Ca^{2+} concentration records shown in Fig. 4 A. The plot in Fig. 4 C illustrates the relationship between the conditioning K^+ - Ca^{2+} transients versus the resulting Ca^{2+} release (*open circles*) and the magnitude of the peak rate of rise of the C- Ca^{2+} transients (*filled squares*). In this figure, as well as in Fig. 5, the areas under the K^+ - and C- Ca^{2+} transients are plotted rather than peak Ca^{2+} concentrations to better represent the magnitude of the Ca^{2+} increase. Notice that a TR component was not produced in this cell when caffeine was applied without a conditioning K^+ - Ca^{2+} transient. It is clear from Fig. 4 C that both the magnitude of the C- Ca^{2+} transients and their peak rate of rise reach saturation after three to four conditioning K^+ - Ca^{2+} transients. These results are expected if the generation of the TR response requires sufficient loading of intracellular Ca^{2+} reservoirs with limited capacity for Ca^{2+} storage. Since the supply of additional Ca^{2+} by transmembrane Ca^{2+} influx readily reestablishes the transient component of release, a long-lasting “fatigue” of Ca^{2+} release channels cannot explain the TR abatement phenomena.

A somewhat different behavior often observed in the recovery of the TR component is shown in Fig. 5. Unlike the cell in Fig. 4, this cell displayed a TR response when first challenged with caffeine (Fig. 5 A, trace *a*). Cells exhibiting this behavior are common during the first few days in culture. Here, the replenishment of the Ca^{2+} store was carried out by preceding each caffeine application with a single conditioning K^+ - Ca^{2+} transient, whose magnitude was regulated by varying the duration of the high K^+ application. As shown in the plot shown in Fig. 5 B, the area under the C- Ca^{2+} transient increases gradually as the area under the filler Ca^{2+} transient increases. This suggests a close correlation between the filling status of the store and the magnitude of the subsequent Ca^{2+} release. Interestingly, an abrupt increase in the magnitude of the C- Ca^{2+} tran-

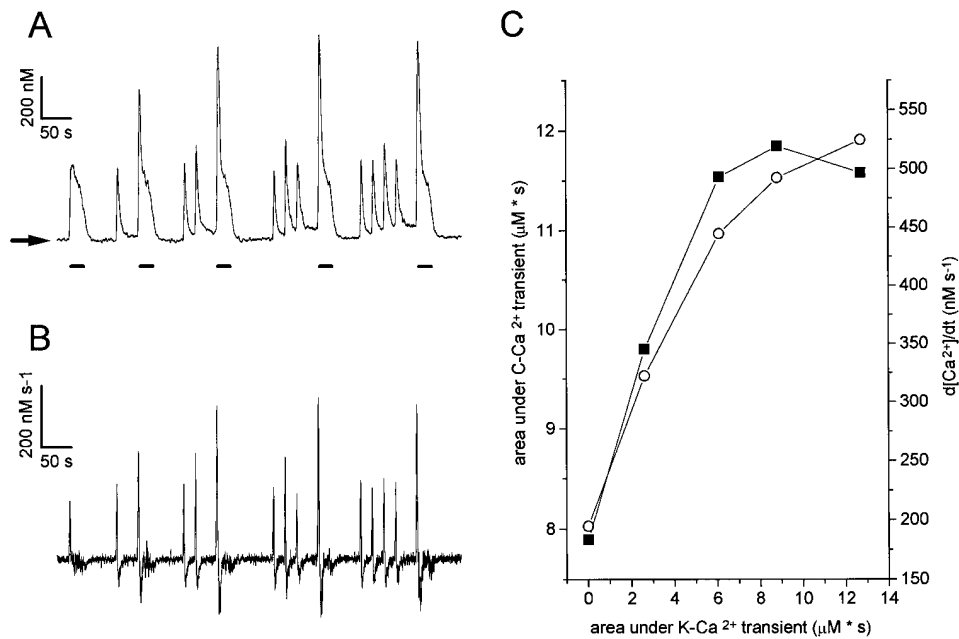


FIGURE 4. Recovery of the TR component in a sympathetic neuron maintained in culture for 10 days. (A) Influence of 1–4 filler K⁺-Ca²⁺ transients (each initiated by 250-ms depolarizations with high K⁺ solution) on the Ca²⁺ release produced by application of 10 mM caffeine for 25 s (horizontal bars). (B) First derivative of records shown in A. (C, open circles and left y-axis) Relationship between the total area under the conditioning K⁺-Ca²⁺ transients and the area under the resulting Ca²⁺ release. (Filled squares and right y-axis) Peak rate of rise obtained from the derivatives shown in B. A transient component was absent from this cell when caffeine was applied without a conditioning K⁺-Ca²⁺ transient. Notice that both the magnitude and peak rate of rise of caffeine responses reached saturation after 3–4 conditioning high K⁺ applications. Horizontal arrow indicates resting [Ca²⁺].

sient occurs when the area under the filler Ca²⁺ transient reaches a critical value. This discontinuity coincides with the generation of the TR component (Fig. 5 A, trace *k*). These results support the notion that an all-or-none regenerative mechanism underlies the TR component. Further increasing the area under the K⁺-Ca²⁺ transient did not increase the size of the TR component nor the area under the C-Ca²⁺ transient (Fig. 5 A, trace *l*), as if the release were self-limited or the stores had a finite capability to accumulate Ca²⁺. Previous studies have shown that Ca²⁺ stores of intact cardiac myocytes reach a limiting Ca²⁺ content that cannot be exceeded regardless of the loading stimulation protocol used (Bassani et al., 1995). Feedback inhibition of Ca²⁺ uptake by Ca²⁺ load of intracellular stores (Favre et al., 1996) may explain the apparent limiting Ca²⁺ content. Notice that the response elicited by the initial caffeine application (trace *a*) is very similar to that produced when the reservoir is full (see traces *k* and *l*). This suggests that in resting sympathetic neurons a mechanism exists that ensures that caffeine-sensitive Ca²⁺ stores remain filled nearly to the limit of their capacity, thereby allowing an expeditious Ca²⁺ efflux whenever RyRs open, either in response to Ca²⁺ or other endogenous agonist.³

³The experiment shown in Fig. 5 summarizes results from over 12 similar experiments that showed the described phenomenon, but that could not be consummated because of a gradual and irreversible increase in resting Ca²⁺ levels followed by depression of Ca²⁺ transients.

We also tested whether or not lower concentrations of caffeine were capable of eliciting a TR response provided that Ca²⁺ stores were replete. Under conditions where 10 mM caffeine invariably gave a TR component, 3 or 5 mM of caffeine was unable to produce it (data not shown). These results indicate that the development of the TR component requires both a high Ca²⁺ content of intracellular stores and the activation of a sufficient number of Ca²⁺ release channels. Either of these conditions, occurring separately, do not support a TR response.

Tetracaine and Intracellular BAPTA Suppress the TR Component

Local anesthetics tetracaine and procaine affect excitation-contraction coupling by reducing Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (Endo, 1985). Thus, if the TR component was the result of regenerative activation by CICR, it should be reduced or even abolished by tetracaine. For these experiments, tetracaine was applied from a third puffer pipette for 30 s (only during the interval between the last conditioning K⁺-Ca²⁺ transient and the test caffeine application). This maneuver allowed us to explore the effects of tetracaine on the kinetics of the release mechanism without affecting voltage-gated Ca²⁺ influx or Ca²⁺ loading of intracellular stores. Fig. 6 A shows control responses from a sympathetic neuron to the filler high K⁺ applications and then to 10 mM caffeine. A TR component is clearly observed in response to caffeine. As shown in Fig. 6 B, the use of 500 μM tet-

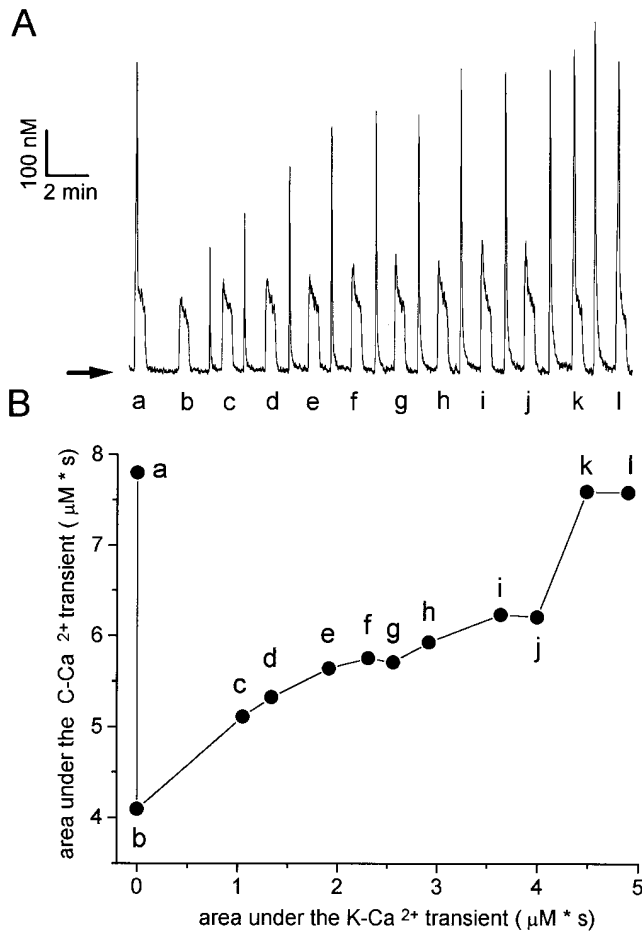


FIGURE 5. Recovery of the TR component in a sympathetic neuron maintained for 2 d in culture. (A) In this experiment, each caffeine application (except the first one) was preceded with a conditioning K^+ - Ca^{2+} transient, whose magnitude was varied by changing the duration of the high K^+ application between 50 ms and 2 s. (B) Relationship between the area under each C- Ca^{2+} transient (labeled *a* through *l*) and the area under the preceding K^+ - Ca^{2+} transient. The gradual increase of the area under the caffeine response suggests a correlation between the filling status of the store and the magnitude of the subsequent Ca^{2+} release. The generation of a TR component coincides with an abrupt area increase (trace *k*), suggesting an all-or-none regenerative mechanism. Further increasing the area under the conditioning K^+ - Ca^{2+} transient did not increase the size of the TR component nor the area under the C- Ca^{2+} transient (see trace *l*). Horizontal arrow indicates resting $[Ca^{2+}]$.

racaine before the caffeine application completely suppressed the TR component, with less effect on the PR component. The TR component recovered after 5 min of tetracaine wash-out (see Fig. 6 C). Similar results were obtained in 5 other experiments. In 13 additional experiments, tetracaine reduced the amplitude of both TR and PR release components to $1,177.8 \pm 187$ and 269 ± 24.1 nM (mean \pm SE), respectively. These values are 30 and 20% smaller, respectively, than the control

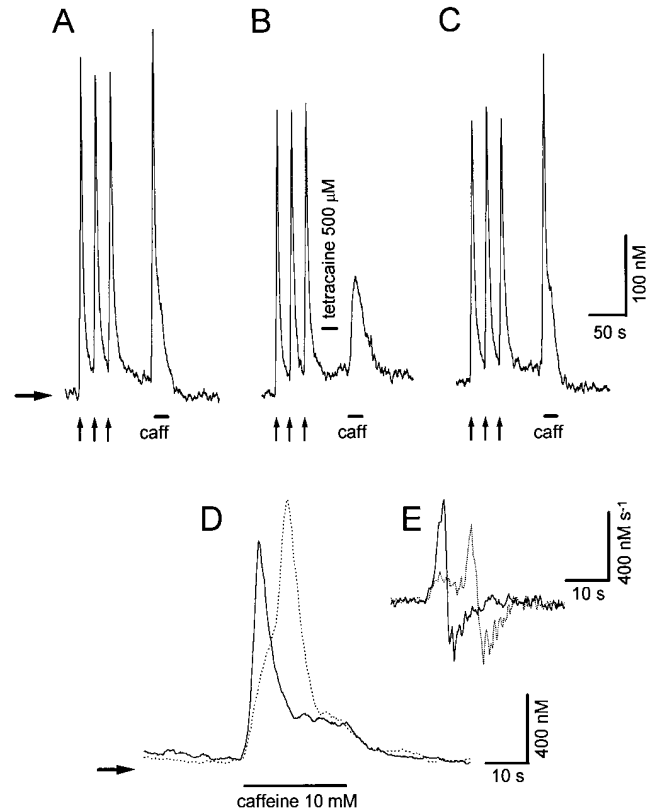


FIGURE 6. Effects of tetracaine on the kinetics of caffeine-induced Ca^{2+} release. (A) Responses of a sympathetic neuron to three 500-ms applications of high K^+ (vertical arrows), and then to a 20-s application of 10 mM caffeine (horizontal bar). Both TR and PR components occur in response to caffeine. (B) Effect of a 30-s application of 500 μ M tetracaine, delivered from a third puffer pipette before the caffeine application. Tetracaine suppressed the TR component, affecting less the PR component. (C) Recovery of the transient release component after 5 min of tetracaine wash-out. (D) Example of an experiment similar to that illustrated in B, but where tetracaine reduced the TR component and delayed its onset (only caffeine responses are shown). Continuous trace: control response; dotted trace: response after tetracaine application. (E) First derivatives of C- Ca^{2+} transients shown in D. Horizontal arrows indicate resting $[Ca^{2+}]$.

data (see above). In many of these cases, the upstroke of the TR component was delayed with respect to their control response after exposure to tetracaine (see Fig. 6 D). This delay (measured as the time interval between the peaks of the derivatives of the Ca^{2+} transients, see Fig. 6 E), ranged from 1.5 to 7.48 s (4.5 ± 0.63 s; mean \pm SE; $n = 13$), and probably results from tetracaine not being present long enough to abolish the positive feedback mechanism that underlies the TR component.

The tetracaine sensitivity of the TR component supports the notion that it may constitute a regenerative response fueled by CICR. This presumption was corroborated by experiments where the kinetics of caf-

feine-induced release were examined before and after the cells had been incubated with the acetoxymethyl ester form of the fast calcium buffer BAPTA (10 μ M). A combination of BAPTA-AM concentration and incubation time was found such that the time constants of decay of K⁺-Ca²⁺ transients increased slightly, but their amplitude did not show a drastic reduction (see Fig. 7 C). This condition indicated that intracellular BAPTA had reached sufficient concentration to began competing with Ca²⁺ extrusion mechanisms, but not enough to significantly compete with fura-2 for Ca²⁺ binding. As shown in Fig. 7, A and B, after 10 min of incubation, BAPTA had two main effects: (a) it slowed the decay of the filler K⁺-Ca²⁺ transients (a monoexponential fit to the decay phase of the third K⁺-Ca²⁺ transient gave a time constant of 6.4 s before and 10.6 s after BAPTA), and (b) it eliminated the TR component. Similar results were obtained in 5 additional experiments. In 9 other cases, where the TR component was spared (see an example in Fig. 7 C), the combined amplitude of TR and PR components diminished after incubation with BAPTA from 923.6 ± 91.4 nM to 739.5 ± 91.4 nM (mean \pm SE). In addition, TR and PR components after BAPTA treatment were only 500.3 ± 59.6 and 257.7 ± 33 nM, respectively. It is noteworthy that after incubation with BAPTA, the separation between the TR and PR components became much less discernible (Fig. 7 C), as if BAPTA was also impeding Ca²⁺ binding to inhibitory regulatory sites on the RyRs which may be partially responsible for the decay of the TR component (see below).

All experiments depicted so far support the hypothesis that CICR underlies the fast release component initiated by caffeine in nerve cells: This component results entirely from intracellular Ca²⁺ release and is inhibited by tetracaine and intracellular BAPTA, which interfere with Ca²⁺-mediated positive feedback loops by two completely different mechanisms. The suppression by intracellular BAPTA or tetracaine of a fast kinetic component of calcium release in skeletal muscle is one of the strongest evidences supporting the assertion that it constitutes a release component controlled by calcium (Jacquemond et al., 1991; Pizarro et al., 1992). An important property of the TR component is that its appearance requires the simultaneous activation of a significant fraction of Ca²⁺-release channels together with an adequate loading of intracellular Ca²⁺ stores. This property suggests a dependence on the rate of rise of trigger calcium.

Mechanisms Involved in the Termination of the TR Component: Sr²⁺ Substitution

The kinetics of Ca²⁺ release depicted in this study are consistent with a Ca²⁺-dependent dual feedback con-

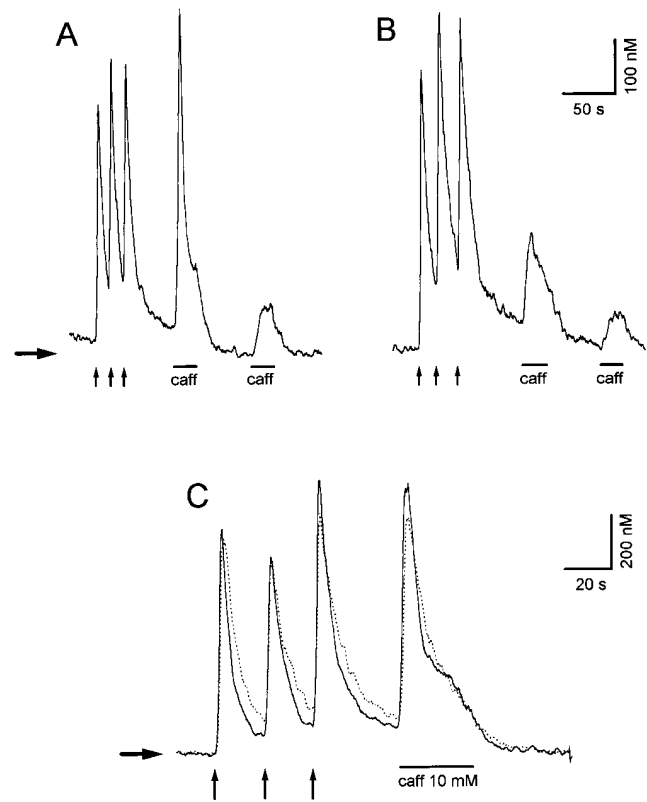


FIGURE 7. Effects of BAPTA-AM on the kinetics of caffeine-induced release. (A) Recordings of Ca²⁺ transients elicited by three applications of high K⁺ (1 s each, vertical arrows) and two applications of 10 mM caffeine (25 s each, horizontal bars) in a fura-2-loaded sympathetic neuron. (B) The same experiment was repeated after incubating the cell for 10 min in the presence of 10 μ M of BAPTA-AM. Incubation with BAPTA-AM slowed the decay of the K⁺-Ca²⁺ transients and eliminated the TR component. (C) Example of an experiment where the TR component was spared. Note changes in the kinetics of decay of both K⁺- and C- Ca²⁺ transients. Horizontal arrows indicate resting [Ca²⁺].

trol mechanism proposed for cardiac cells (Fabiato, 1985). According to this model, the abrupt termination of the TR component could be explained by Ca²⁺-dependent inactivation of release. However, other factors, such as adaptation of RyR/Ca²⁺ release channels (Györke and Fill, 1993; Stern, 1996) or rapid depletion of releasable Ca²⁺ from intracellular stores cannot be ruled out. Ca²⁺ substitution with permeant divalent cations like Sr²⁺ or Ba²⁺ has provided valuable insights on Ca²⁺ dependent phenomena, such as Ca²⁺-mediated inactivation of voltage-gated Ca²⁺ channels (Tillotson, 1979). For the most part, these ionic replacement experiments have been useful because Ba²⁺ and Sr²⁺ do not interact as efficiently as Ca²⁺ with regulatory binding sites (Oberhauser et al., 1988). Since Sr²⁺ binds to fura-2 with relatively high affinity, and the spectral properties of the complex are similar to those of fura-2 bound with Ca²⁺

(Kwan and Putney, 1990), we decided to examine the effects of substituting Sr^{2+} for Ca^{2+} on the kinetics of TR and PR components. We were hoping that this maneuver would provide clues to better understand the mechanisms that underlie onset and termination of the release process.

Fig. 8 shows fura-2 fluorescence changes obtained from a rat sympathetic neuron after undergoing the Sr^{2+} replacement procedure described in MATERIALS AND METHODS. As shown in the first half of Fig. 8, both depolarization and caffeine-induced fluorescence changes continue in Sr^{2+} -containing saline. This demonstrates that Sr^{2+} substitutes well for Ca^{2+} both in voltage-gated influx and agonist-mediated intracellular release. Control experiments showed that responses to both stimuli were eliminated after manipulating the cells in a similar fashion but with solutions lacking both Ca^{2+} and Sr^{2+} (data not shown). Sr^{2+} transients reach much higher concentrations than Ca^{2+} transients do. This could be due in part to the fact that Ca^{2+} binding proteins and Ca^{2+} extrusion mechanisms bind Sr^{2+} less efficiently than Ca^{2+} . Nonlinearity of the dye signal should not be a problem here, since the maximum concentrations reached (about $10 \mu\text{M}$) are similar to the k_d of fura-2 for Sr^{2+} ($7.6 \mu\text{M}$; Kwan and Putney, 1990). The kinetics of Sr^{2+} transients shown in Fig. 8 is quite different from that recorded in the presence of Ca^{2+} . Most noticeably, Sr^{2+} excursions decay more slowly, reflecting a less efficient Sr^{2+} uptake and extrusion by metabolic pumps (Rasgado-Flores et al., 1987; Berman and King, 1990). Further diminution of buffering ca-

capacity is observed when the cell is stimulated repeatedly. The time constants of monoexponential functions fitted to the decay phases (τ_d) of depolarization-induced (*small arrows*) and caffeine-induced (*large arrows*) Sr^{2+} signals, increased progressively from their initial values 7.3 and 6.8 s, respectively, (first pair of responses in Fig. 8) to 10.2 and 11.84 s (sixth pair of responses in Fig. 8). Near the middle of the recording, $20 \mu\text{M}$ ryanodine was added to the bath solution and alternate stimulation with high- K^+ and caffeine was restated 2 min later. Shortly after its application, ryanodine produced a step increase in resting $[\text{Sr}^{2+}]$ and reduced the rate of decay of the next caffeine response ($\tau_d = 19.7$ s). Once the use-dependent suppression of caffeine responses was established (*asterisks*), the rate of decay of depolarization-induced Sr^{2+} transients increased significantly, from a $\tau_d = 10.0$ s (first deflection after stimulation reinitiated) to 17.0, 17.1, 18.7, and 19.9 s, in the following four responses. The effects of continuous ryanodine exposure are similar to those observed in the presence of Ca^{2+} (data not shown) and are consistent with a locking of the release channels in an open state (Pesah and Zimanyi, 1991).

Fig. 9 compares fluorescence changes recorded from another cell, first, when it was bathed in Ca^{2+} -containing saline (Fig. 9 A) and then in Sr^{2+} -containing saline (Fig. 9 B), immediately after undergoing the Sr^{2+} replacement procedure (see MATERIALS AND METHODS). The stimulation protocol consisted of four conditioning 0.5-s pulses of high K^+ with 10 mM of either Ca^{2+} or Sr^{2+} to preserve the filling status of intracellular stores,

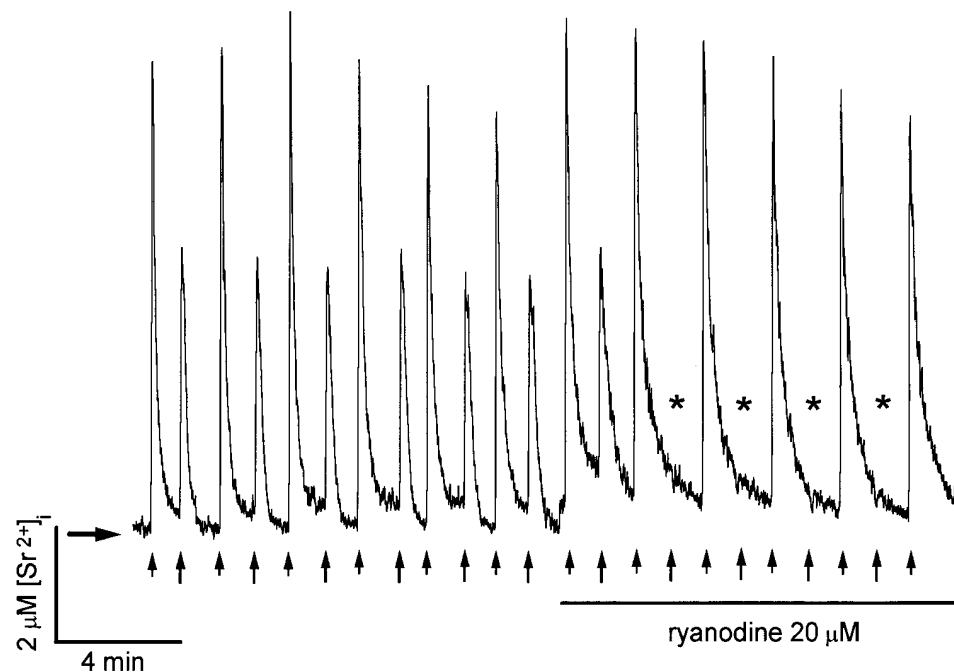


FIGURE 8. Recording of fura-2 fluorescence changes in a sympathetic neuron after undergoing the Sr^{2+} replacement procedure (see MATERIALS AND METHODS). High K^+ (1 s; *short arrows*) and 10 mM caffeine (20 s; *long arrows*) were applied alternatively with independent puffer pipettes. Near the middle of the recording, $20 \mu\text{M}$ ryanodine was added to the bath, and 2 min later, alternate stimulation with high- K^+ and caffeine restated. Caffeine responses are eliminated in a use-dependent manner after exposure to ryanodine (*asterisks*). Horizontal arrow indicates resting $[\text{Sr}^{2+}]$.

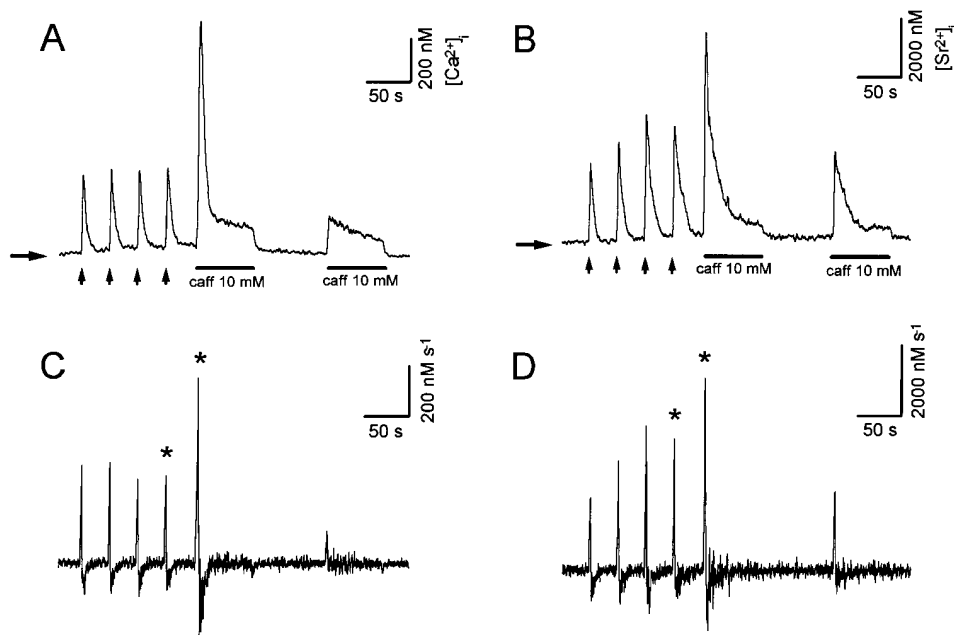


FIGURE 9. Effects of replacing Ca^{2+} with Sr^{2+} . (A) Ca^{2+} concentration changes recorded from a sympathetic neuron bathed with normal, Ca^{2+} -containing saline. The stimulation protocol consisted of four conditioning applications of high K^{+} solution (0.5 s each, vertical arrows), followed by two applications of 10 mM caffeine in saline containing 2 mM Ca^{2+} (60 s each, horizontal bars). (C) First derivative of records shown in A. (B) Fluorescence changes obtained from the same cell immediately after undergoing the Sr^{2+} replacement procedure (see MATERIALS AND METHODS). The stimulation protocol was repeated under conditions where EGTA (500 μM) was added to all bathing solutions, and Ca^{2+} was equimolarly replaced with Sr^{2+} . (D) First derivative of records shown in B. Asterisks indicate corresponding responses to transmembrane flux and intracellular release before and after Sr^{2+} substitution (see text). Horizontal arrows indicate resting $[\text{Ca}^{2+}]$ and $[\text{Sr}^{2+}]$.

followed by two pulses of 10 mM caffeine in saline containing either Ca^{2+} or Sr^{2+} , to examine the kinetics of release. Besides the differences mentioned before, the most notorious dissimilarities were in the dynamics of release from intracellular stores. In the presence of Ca^{2+} , the first caffeine application elicited TR and PR components, with distinct rates of decay ($\tau_{\text{dTR}} = 4.2$ s, $\tau_{\text{dPR}} = 43.9$ s). In contrast, only a single component of release with a monoexponential decay ($\tau_{\text{dPR}} = 11.5$ s) was apparent after the Sr^{2+} replacement procedure. Fundamental differences also existed in the response to the second caffeine application: While in Ca^{2+} the TR component was abolished with only the PR component remaining ($\tau_{\text{dPR}} = 59$ s), a significant initial fast release persisted in Sr^{2+} . Moreover, the rate of rise of the second caffeine response in Sr^{2+} was almost as large as the first one (compare Fig. 9, C and D). The decay of the second caffeine-induced Sr^{2+} release was also fitted with a single exponential function ($\tau_{\text{d}} = 11.1$ s).

Fig. 9 C shows the first derivatives of the signals resulting from transmembrane Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release. If we focus our attention in the last K- Ca^{2+} transient and in the ensuing C- Ca^{2+} transient, when the Ca^{2+} content of the store is similar (Fig. 9 C, asterisks), it is clear that the latter rises faster, possibly because of the positive feedback amplification that underlies the generation of the TR response, as opposed to the modest amplification exerted on Ca^{2+} signals originated

from Ca^{2+} influx. The same comparison in Fig. 9 D (asterisks) reveals that the differences are smaller in Sr^{2+} . These results are consistent with the notion that Sr^{2+} -induced Sr^{2+} release may operate with lower amplification gain than CICR in rat sympathetic neurons.

The kinetics of caffeine-induced Sr^{2+} mobilization is consistent with Sr^{2+} release operating with lower feedback loop gain (both positive and negative) than the release of Ca^{2+} . Consequently, a distinct TR response was not produced in Sr^{2+} , and the diminution of the initial fast release during the second caffeine challenge was less pronounced. When Ca^{2+} was the divalent cation involved, substantial amplification by CICR determined a conspicuous TR response, whose abrupt termination may result of both rapid depletion of releasable Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent inactivation/adaptation of RyR channels (see DISCUSSION).

The Main Kinetic Aspects of Caffeine-induced Release Can Be Reproduced with a Simple Mathematical Model

Fig. 10 illustrates the result of a simulation obtained with our mathematical model. Traces shown from top to bottom are: mean cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$; luminal $[\text{Ca}^{2+}]$ in the ER compartment that takes up Ca^{2+} (thick line) and in the ER compartment that releases it (thin line); normalized Ca^{2+} occupancy of the activating (thin line) and inactivating (thick line) regulatory sites of the RyRs.

Caffeine application was simulated by increasing the association rate constant for Ca^{2+} binding to the activation sites, which greatly increases the open probability of release channels. When intracellular reservoirs are filled with sufficient Ca^{2+} (first caffeine response), a steep initial release of Ca^{2+} is produced (Fig. 10 B, *thin line*). Because of their faster association rate constant,

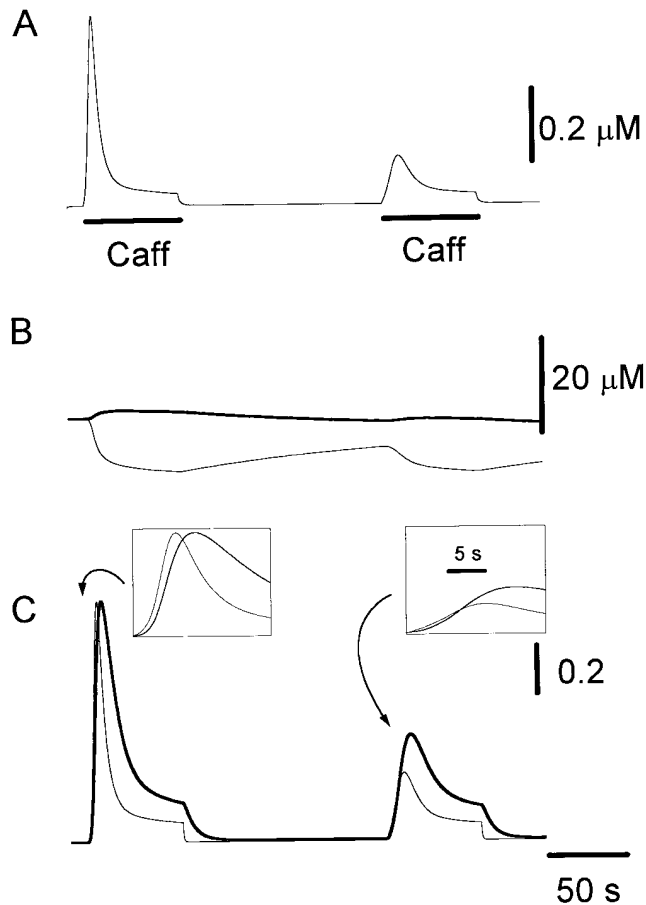


FIGURE 10. Simulation of Ca^{2+} mobilization obtained by integrating the diffusion mathematical model: (A) mean cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$, (B) luminal $[\text{Ca}^{2+}]$ in the ER compartment that takes up Ca^{2+} (Ca_{ERs} ; *thick line*) and in the ER compartment that releases it (Ca_{ERi} ; *thin line*), (C) normalized Ca^{2+} occupancy of activating (*thin line*) and inactivating (*thick line*) regulatory sites on the RyR channels. The effects of two separate 60 s caffeine applications are shown. Initial parameters used in the integration were as follows: $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}} = 2 \text{ mM}$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ERi}} = 75 \text{ } \mu\text{M}$, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ERs}} = 75 \text{ } \mu\text{M}$, $B_{\text{Tot}} = 50 \text{ } \mu\text{M}$, $a\text{RyR}_{\text{Tot}} = 0.1 \text{ } \mu\text{M}$, $i\text{RyR}_{\text{Tot}} = 0.1 \text{ } \mu\text{M}$, $l\text{RyR}_{\text{Tot}} = 0.1 \text{ } \mu\text{M}$, $\text{Rate}_{\text{ppm}} = 100 \text{ s}^{-1} \text{ } \mu\text{m}^{-2}$, $\text{Rate}_{\text{perm}} = 100 \text{ s}^{-1} \text{ } \mu\text{m}^{-2}$, $\text{PUMP}_{\text{ermTot}} = 0.1 \text{ } \mu\text{M}$, $\text{Pump}_{\text{pmTot}} = 0.1 \text{ } \mu\text{M}$, $D_{\text{Ca}} = 200 \text{ } \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$, $dx = 0.25 \text{ } \mu\text{m}$, $ds = 0.8 \text{ } \mu\text{m}^2$, $ds_{\text{erm}} = 0.4 \text{ } \mu\text{m}^2$, $\text{vol}_{\text{ER}} = 100 \text{ } \mu\text{m}^3$, $k_{\text{offB}} = 1 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{onB}} = 0.5 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $\text{RyR}_{\text{max}} = 70,000 \text{ s}^{-1} \text{ } \mu\text{m}^{-2}$, $k_{\text{offRyR}} = 0.176 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{onIRyR}} = 0.28 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{offIRyR}} = 1,300 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{onIRyR}} = 10 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{on-Caff}} = 0.01 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{on+Caff}} = 2.5 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{offaRyR}} = 2 \text{ s}^{-1}$, $N = 7$, $\text{Caff}_{\text{dur}} = 60 \text{ s}$. The inserts shown on an expanded time scale allow a comparison of the kinetics of Ca^{2+} binding to the activation and inactivation sites during the first and second caffeine applications.

the activation sites are occupied more quickly by the step-like increase in $[\text{Ca}^{2+}]$ than the inactivation sites (Fig. 10 C, *left inset*), promoting further release that in turn may act as trigger Ca^{2+} to activate additional RyRs. This positive feedback loop is responsible for the regenerative response here termed TR component. The early phase of fast release is terminated by way of two independent processes: (a) slower but more prolonged occupation of the inactivation Ca^{2+} binding sites of the RyRs, leading to a decrease in open probability (Fig. 10 C, *thick line*), and (b) depletion of $[\text{Ca}^{2+}]$ in the ER compartment (Fig. 10 B, *thin line*), which reduces the driving force for calcium efflux. A more sustained release at a lower rate is maintained throughout the caffeine application (PR component). When caffeine is re-applied after a relatively short delay, a smaller Ca^{2+} ef-

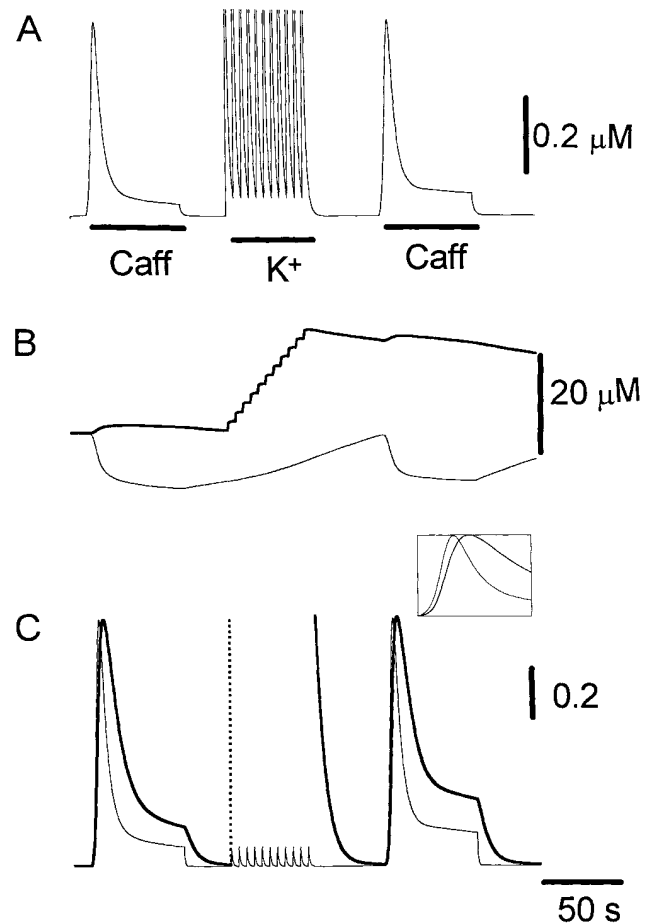


FIGURE 11. Simulation similar to that of Fig. 10, but with eleven depolarizing pulses given during the interval between the two caffeine applications to rapidly refill intracellular Ca^{2+} stores. The initial parameters used were the same as those in the simulation of Fig. 10, with the addition of Ca^{2+} flux pulses of $\text{Ca}_{\text{ChDur}} = 0.5 \text{ s}$ in duration, interstimulus interval $\text{Ca}_{\text{ChInt}} = 5 \text{ s}$ and a rate $\text{Ca}_{\text{Chmax}} = 40 \text{ s}^{-1} \text{ } \mu\text{m}^{-2}$.

flux is produced because the stores have not refilled completely (Fig. 10 *B*, *thick line*). Consequently, Ca^{2+} accumulates more slowly at the cytoplasmic side of the RyRs, with the change in $[\text{Ca}^{2+}]$ resembling more a ramp than a step. In this case, the inactivating sites of the RyR are occupied with Ca^{2+} almost as quickly as the activation sites (Fig. 10 *C*, *right inset*), thereby suppressing the regenerative TR response. The situation is comparable to that of voltage-gated sodium channels induced to open with a slowly rising voltage ramp. Inactivation overcomes activation, thus preventing the generation of an action potential. As shown in Fig. 11, our model also predicts the recuperation of the TR response if additional Ca^{2+} is supplied by way of voltage-gated Ca^{2+} influx before the second caffeine application. These episodes of additional Ca^{2+} influx increase significantly the Ca^{2+} content of intracellular stores (Fig. 11 *B*, *thick line*), but since they produce relatively slow changes in $[\text{Ca}^{2+}]$ at the RyR regulatory sites, inactivation dominates activation and no CICR is produced (Fig. 11 *C*; compare *thick* and *thin lines*). The production of a TR component during the second caffeine application results from the increased initial Ca^{2+} efflux, which, by allowing a faster occupation of the activation sites with Ca^{2+} than the inactivation sites (Fig. 11 *C*, *inset*), provide the means for triggering a regenerative release response.

According to this very simplified model, the filling status of intracellular stores is one of the most relevant aspects governing the kinetics of Ca^{2+} release, by determining the rate of change of cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ and the occupation rate of activation Ca^{2+} binding sites of the RyRs. Undoubtedly, a multiplicity of other parameters, such as spatial organization of Ca^{2+} stores and buffering mechanisms, as well as interaction between neighboring release channels and Ca^{2+} stores, must come into play to determine the spatial distribution and release dynamics of Ca^{2+} signals in real cells (Stern, 1992). Nevertheless, the conclusions from this work provide certain constraints as to which functional roles neuronal Ca^{2+} stores can and cannot perform. In this regard, ryanodine-sensitive stores appear to be organized to emphasize subcellular Ca^{2+} gradients initiated by agonist-induced intracellular release, rather than to produce widespread amplification of Ca^{2+} signals originated from transmembrane Ca^{2+} influx. Naturally, this does not exclude the possibility that ryanodine-sensitive stores located near the plasma membrane may produce substantial local amplification of Ca^{2+} signals originated from transmembrane Ca^{2+} influx.

DISCUSSION

Voltage-gated Ca^{2+} influx in nerve cells is not very effective to initiate widespread CICR under physiological

conditions (Verkhatsky and Shmigol, 1996). A likely explanation is that Ca^{2+} must diffuse from the plasmalemma to the endoplasmic reticulum over relatively long distances, and $[\text{Ca}^{2+}]$ cannot rise sufficiently fast near the RyRs to effectively activate them (Hernández-Cruz, et al., 1995; Shmigol et al., 1995). Conversely, Ca^{2+} released directly from intracellular reservoirs is more likely to efficiently change $[\text{Ca}^{2+}]$ in the microenvironment surrounding the RyRs. This implies that both positive and negative feedback regulation of Ca^{2+} release by Ca^{2+} (Fabiato, 1985) should be more apparent after intracellular release than after transmembrane calcium entry. These assumptions are supported by the experiments described here. One possible exception to this scheme would be the RyRs located on specialized endoplasmic reticulum organelles, called subsurface cisternae (Watanabe and Burnstock, 1976). In fact, the most convincing examples of physiologically relevant CICR phenomena after transmembrane Ca^{2+} influx in nerve cells involve the regulation of plasmalemmal channels, presumably by Ca^{2+} released from submembrane domains (Kawai and Watanabe, 1989; Sah and McLachlan, 1991; Yoshizaki et al., 1995).

This study was aimed to identify the physiological parameters that determine the dynamics of Ca^{2+} release from ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores in rat sympathetic neurons. For simplicity, we focused on Ca^{2+} release phenomena triggered by caffeine, but the same conclusions should be applicable to Ca^{2+} release initiated by natural agonists (Hua et al., 1994). Caffeine-induced release comprises two ryanodine-sensitive kinetic components, a fast initial release (TR component), and a delayed, persistent release (PR component). The early event shows refractoriness resulting from the depletion of releasable Ca^{2+} , and requires both the adequate activation of Ca^{2+} release channels and sufficient loading of intracellular stores. This behavior suggests a strong dependence on the rate of rise of trigger calcium. Tetracaine and BAPTA-AM, which interfere with Ca^{2+} -mediated positive feedback loops by two different mechanisms, suppress the TR component, supporting the notion that it is a CICR phenomenon. Our data also suggest that the abrupt termination of the TR component results both from rapid depletion of releasable Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent inactivation or adaptation of RyRs.

Caffeine-induced Intracellular Ca^{2+} Mobilization in Nerve Cells Comprises Two Kinetic Components, One of which Is a CICR-dependent Phenomenon

This work provides evidence for two separate components of caffeine-induced Ca^{2+} release. The TR component is expected from the regenerative nature of CICR if released Ca^{2+} can promote its own release by a positive feedback mechanism (see below). The PR compo-

ment may result from a sustained nonregenerative activation of release balanced with Ca^{2+} uptake (Kuba, 1994).

The TR component can only be observed when Ca^{2+} stores are replete. A similar loading-dependent property has been described for InsP_3 -induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells (Iino and Endo, 1992) and Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum of intact cardiac myocytes (Bassani et al., 1995). Several circumstances may combine to explain the effects of increasing the Ca^{2+} content of the store: (a) an increased transmembrane Ca^{2+} gradient, (b) an increased rate of Ca^{2+} release (Donoso et al., 1995), (c) an increased open probability of release channels (Vélez and Suárez-Isla, 1992; Sitsapesan and Williams, 1994; Tripathy and Meissner, 1996), and (d) an increased caffeine sensitivity of overfilled neuronal Ca^{2+} stores (Verkhatsky and Shmigol, 1996). Also, CICR is strongly dependent on the rate of rise of trigger calcium, a phenomenon that probably involves fast competition between Ca^{2+} -dependent activation and inactivation of release channels (Fabiato, 1985, 1992; see below). Thus, the filling status of the Ca^{2+} store may affect the kinetics of release to the extent that it affects the initial rate of Ca^{2+} release. Accordingly, a second TR response cannot be generated (even with a high caffeine concentration) when Ca^{2+} stores are partially depleted, probably because $[\text{Ca}^{2+}]$ does not rise sufficiently fast to initiate CICR. Experiments in cardiac myocytes have demonstrated that the fractional Ca^{2+} release (the percentage of SR Ca^{2+} content released by a twitch) increases steeply as the SR Ca^{2+} load increases. Conversely, Ca^{2+} release is almost abolished when SR content falls below 40% of its maximum (Bassani et al., 1995).

Our results are inconsistent with the "quantal Ca^{2+} release" hypothesis according to which individual stores release their content in an all-or-none manner once their threshold for caffeine is reached (Cheek et al., 1994). If this scheme were true, application of caffeine concentrations <10 mM should elicit CICR phenomena involving low-threshold caffeine-sensitive Ca^{2+} stores. Likewise, the recruitment of Ca^{2+} stores with higher caffeine threshold should give rise to TR responses of their own, regardless of prior activation of low-threshold Ca^{2+} stores. This type of behavior was not observed (see Fig. 3 C). Recent experiments in a skeletal muscle cell line (Györke and Györke, 1996), suggest that the incremental Ca^{2+} release phenomenon cannot be accounted for by "quantal" Ca^{2+} release but by adaptive control of release units (Györke and Fill, 1993).

The TR component has properties expected from a CICR phenomena: (a) it exhibits refractoriness, (b) it requires the activation of minimum fraction of Ca^{2+} -release channels (threshold), (c) it requires sufficient loading of intracellular Ca^{2+} reservoirs (i.e., it depends

on the rate of rise of trigger Ca^{2+}), (d) it behaves as an all-or-none regenerative process once a critical amount of loading is achieved, and (e) it is inhibited by drugs that restrict or abolish Ca^{2+} -mediated positive feedback loops. One important conclusion of these experiments is that CICR in nerve cells is possible whenever the conditions are met which allow the generation of adequate trigger Ca^{2+} signals. Interestingly, freshly dissociated sympathetic neurons, or cells that have been in culture for 1–3 d, maintain their caffeine-sensitive Ca^{2+} stores occupied nearly to the limit of their capacity, despite the absence of spontaneous electrical activity. This physiological status supports an effective Ca^{2+} efflux whenever RyR open, either in response to Ca^{2+} or any other endogenous agonist (Bassani et al., 1995). This differs from the situation in older cultures of sympathetic neurons or in most studies with central neurons, where in order to obtain full-sized caffeine responses, ER stores have to be charged with releasable Ca^{2+} beforehand (Shmigol et al., 1994).

Tetracaine and BAPTA-AM Suppress the TR Component of the Release by way of Different Mechanisms

The local anesthetic tetracaine reduces Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in several preparations (Endo, 1985). Presumably, these effects result from direct inhibition of channel activity by binding to high-affinity, regulatory sites on the RyRs (Xu et al., 1993). In our experiments, tetracaine reached the cell only during the interval between the last conditioning K^+ - Ca^{2+} transient and the following caffeine application. This was necessary to prevent tetracaine effects on voltage-gated Ca^{2+} influx and Ca^{2+} loading of intracellular stores that would have resulted from inhibition of voltage-gated Ca^{2+} channels with the tetracaine concentrations used here (Sugiyama and Muteki, 1994). In preliminary experiments, when tetracaine was applied continuously, rather than for a short period of time, we observed that the TR responses were always blocked. The brief exposure to tetracaine in the experiments reported here underestimates its effects on caffeine-induced Ca^{2+} release. In fact, they clearly show that CICR is more sensitive to tetracaine than voltage-gated Ca^{2+} influx, since it was able to delay, and in some cases suppress the TR component, sparing the PR component. These results are consistent with the reported inhibition by tetracaine of Ca^{2+} -gated channel activity by an allosteric mechanism rather than by blockade of the RyR channel (Xu et al., 1993).

In contrast to tetracaine, BAPTA does not interact directly with the RyRs. We used this high-affinity fast diffusible Ca^{2+} buffer to try to prevent the interaction between released Ca^{2+} and RyRs regulatory Ca^{2+} binding sites. A measure of the ability of exogenous Ca^{2+} buff-

ers to compete with other Ca^{2+} binding sites is their association rate constant (k_{on}). Since BAPTA's k_{on} is almost diffusion limited ($\sim 6.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; see Kao and Tsien, 1988) and free BAPTA is likely to equilibrate with cytosolic Ca^{2+} in $< 3 \mu\text{s}$ (Adler et al., 1991), it is expected to compete effectively for Ca^{2+} with the RyR activating sites, thus limiting the feedback loop gain that underlies CICR phenomena. In some experiments, BAPTA was able to suppress the TR component without affecting Ca^{2+} transients induced by Ca^{2+} influx (see Fig. 7 B). In other cases, the TR component was spared, but the separation between TR and PR components became less discernible (see Fig. 7 C, *dotted trace*). These effects of BAPTA on the kinetics of decay of the caffeine-induced release are reminiscent of the effects of Sr^{2+} substitution (see Fig. 9 B). In both cases, the decay of the TR component becomes slower, conceivably as a result of a decreased interaction of the divalent cation with inhibitory regulatory binding sites on the RyRs (see below). Cells massively loaded with fura-2, (1-h incubation or more) often display alterations of Ca^{2+} dynamics similar to those produced by incubation with BAPTA AM.

Substitution of the Permeant Divalent Cation Provides Kinetic Information on the Onset and Termination of the TR Component of the Caffeine Response

A model of RyR dynamics has been postulated for cardiac cells, whereby the cytoplasmic side of the channel possess two regulatory Ca^{2+} binding sites, one that is fast and positively regulatory and another that is slow and negatively regulatory (Fabiato, 1985). A feedback control by Ca^{2+} on IP_3 -mediated Ca^{2+} release has been demonstrated in flash-photolysis experiments of caged IP_3 and caged Ca^{2+} in permeabilized smooth muscle fibers (Iino and Endo, 1992). Caffeine-induced release in mammalian sympathetic neurons exhibits a bell-shaped dependence on cytosolic Ca^{2+} concentration, which could give rise to positive feedback in the earlier phase of release followed by negative feedback due to Ca^{2+} -dependent inactivation (Hernández-Cruz et al., 1995). Although the kinetics of Ca^{2+} release depicted in the present study was seemingly consistent with this dual feedback control mechanism, it was uncertain to what extent the termination of the TR component could depend on Ca^{2+} -dependent inactivation since for the most part, the reported biphasic Ca^{2+} dependence is more closely related to steady-state conditions. Furthermore, other factors related to the release process, such as adaptation of RyRs (Györke and Fill, 1993) and Ca^{2+} depletion of intracellular stores, could also influence this process.

The Ca^{2+} content of the caffeine-sensitive store diminishes after the generation of a TR response (see

Figs. 1 and 3 A). We can speculate that if local depletion of releasable Ca^{2+} occurs at a sufficiently fast rate, the feedback gain that sustains the activity of release channels would be significantly reduced, thus playing a role in the termination of the TR. Ca^{2+} -dependent inactivation or adaptation, described for RyRs isolated from cardiac sarcoplasmic reticulum (Györke and Fill, 1993), could also participate in terminating the release. Direct evidence for the relative contribution of these mechanisms to the termination of release is difficult to obtain in intact cells, because manipulations that affect Ca^{2+} binding to the inactivation site(s) are likely to affect binding to the activation site(s) as well. Also, cytoplasmic Ca^{2+} removal mechanisms (buffering, sequestration, and extrusion of Ca^{2+}) can become affected in unpredictable ways.

Sr^{2+} permeates through both plasmalemmal and RyR Ca^{2+} channels (Hagiwara and Ohmori, 1982; Williams, 1992) and is taken up by neuronal intracellular stores (Rasgado-Flores et al., 1987). Moreover, Sr^{2+} influx can induce Ca^{2+} release from caffeine-sensitive stores in smooth muscle cells (Grégoire et al., 1993) and binds to fura-2 with high affinity, producing the same type of changes as Ca^{2+} in spectral properties of the dye (Kwan and Putney, 1990). Nevertheless, in part because of its larger ionic radius (Hille, 1992), Sr^{2+} is not expected to interact with Ca^{2+} binding sites on the RyR channel as efficiently as Ca^{2+} . An impaired interaction of Sr^{2+} with regulatory binding sites has been well documented for Ca^{2+} -activated K^+ channels, where Sr^{2+} is ~ 160 times less effective than Ca^{2+} as a channel agonist (Oberhauser et al., 1988). Given these properties, we reasoned that by examining the effects of substituting Ca^{2+} for Sr^{2+} we could gain clues to better understand the mechanisms that underlie the dynamics of caffeine-induced Ca^{2+} release.

As shown in Fig. 8, Sr^{2+} can substitute for Ca^{2+} both in voltage-gated influx and caffeine-induced intracellular release in rat sympathetic neurons. Caffeine-induced signals were abolished by ryanodine, demonstrating that they indeed represent Sr^{2+} release from intracellular stores. A gross contamination by Ca^{2+} in these experiments was ruled out because (a) external Ca^{2+} concentration was maintained below 100 nM throughout the experiment by excluding Ca^{2+} and adding 0.5 mM EGTA to all external solutions, and (b) fura-2 fluorescence signals disappeared altogether when Sr^{2+} was omitted from the external medium. A potentially significant problem could result if a small amount of intracellular Ca^{2+} persists after the Sr^{2+} replacement procedure. The presence of a residual resting Ca^{2+} would seriously affect $[\text{Sr}^{2+}]$ determined with fura-2, because of its higher affinity for Ca^{2+} ($k_d = 0.3 \mu\text{M}$). Nevertheless, this problem should not affect significantly the kinetics of intracellular Sr^{2+} transients.

Fluorescence changes recorded in the presence of Sr^{2+} were different from those obtained in Ca^{2+} . For instance, they decayed more slowly, reflecting a less efficient handling of Sr^{2+} by metabolic pumps (Rasgado-Flores et al., 1987). Most importantly, the kinetics of release from intracellular stores was markedly dissimilar. Rather than the TR and PR components elicited by the first caffeine application when the stores are replete with Ca^{2+} , only a single component of release was apparent in Sr^{2+} , with a decay time constant ($\tau_d = 11.5$ s) intermediate between those of TR and PR components in Ca^{2+} -containing saline ($\tau_{\text{dTR}} = 4.2$ s, $\tau_{\text{dPR}} = 43.9$ s). Two possible explanations exist for this result: (a) the decay of the TR component slows as a result of deficient buffering and (b) TR and PR components fused into one.

The simplest interpretation for a monoexponential decay of caffeine-induced Sr^{2+} release is that Sr^{2+} inactivates its own release much less efficiently than Ca^{2+} and that the kinetics of decay are now dominated by the rate of depletion of intracellular stores. If Sr^{2+} were as effective as Ca^{2+} at activating RyRs, then caffeine should deplete more because of uninterrupted activation in the absence of counteracting inactivation. Nevertheless, as shown in Fig. 9 B, a substantial amount of fast Sr^{2+} release persists during the second caffeine challenge. This could indicate that stores become less depleted of Sr^{2+} at the end of the first caffeine application. This would be possible if feedback activation of RyR is also less effective when Sr^{2+} is the flux carrier. Alternatively, intracellular stores could become equally or even more depleted in the presence of Sr^{2+} , but as inactivation is less effective, Sr^{2+} activation of the RyR channels could still evoke fast release in spite of the reduced intraluminal Sr^{2+} concentration. Comparison of activation and inactivation kinetics of single neuronal RyRs incorporated into lipid bilayers, upon step applications of Ca^{2+} and Sr^{2+} , should help us decide among these possibilities.

When the first derivatives of signals associated to transmembrane Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release are compared under similar conditions of Ca^{2+} content of the intracellular pool (Fig. 9 C, *asterisks*), it is apparent that the latter rises faster. This difference could result from the positive feedback amplification that underlies the generation of TR responses. However, when Sr^{2+} substitutes for Ca^{2+} , the differences in rate of rise between signals associated with influx and release are smaller (Fig. 9 D, *asterisks*). The tentative conclusion of these results is that Sr^{2+} -induced Sr^{2+} release operates with lower amplification gain than CICR in sympathetic neurons.

In summary, the kinetics of caffeine-induced Sr^{2+} mobilization is consistent with the idea that the release of Sr^{2+} operates with a lower feedback loop gain (both

positive and negative) than the release of Ca^{2+} . When Ca^{2+} is the flux carrier, a regenerative TR response can be generated as a result of amplification by CICR. The abrupt termination of this fast release, in spite of the continuous presence of the agonist, appears to be the outcome of both rapid depletion of releasable Ca^{2+} and Ca^{2+} -dependent inactivation or adaptation of release. Single channel recordings of neuronal RyRs would be required to determine more precisely the contribution of Ca^{2+} -dependent inactivation and adaptation to this process.

Mathematical Modeling of Caffeine-induced Ca^{2+} Mobilization

Our mathematical model attempts to describe qualitatively how the macroscopic phenomena observed in real cells relate to the basic properties of CICR. The model belongs to the class of common pool models (see Stern, 1992), meaning that trigger calcium reaches the RyRs via the same cytosolic calcium pool into which the calcium is released. These models are intrinsically unstable. If they are conferred with low loop gain (i.e., calcium release relatively insensitive to cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$), they produce only a moderate amplification of transients produced by the trigger calcium. When the gain is set to a higher value, more amplification is produced, but all-or-none Ca^{2+} transients develop that evolve autonomously when cytoplasmic calcium reaches a certain threshold. In our variant of common pool model, Ca^{2+} entering through plasmalemmal Ca^{2+} channels is insufficient to induce CICR because of the effects of diffusion over several cytosolic compartments. Nevertheless, Ca^{2+} entering through this pathway is readily taken up by intracellular stores, greatly affecting their filling status.

Judging by the modest amplification of Ca^{2+} signals resulting from transmembrane Ca^{2+} influx, CICR in nerve cells constitute an example of low loop gain systems. However, as shown in this study, trigger Ca^{2+} originating from intracellular stores can produce regenerative responses characteristic of high loop gain models. The solution to this apparent discrepancy resides in the rate of rise of trigger Ca^{2+} , which determines the effective gain of CICR: If Ca^{2+} rises sufficiently fast, activation can overcome inactivation and regenerative responses are generated. Conversely, for slowly developing changes in Ca^{2+} concentration, CICR operates with low gain. The notion that the rate of rise of trigger Ca^{2+} is the most important parameter determining the extent of release is supported by experimental and theoretical studies (Fabiato, 1985, 1992; Tang and Othmer, 1994; Stern 1996). The main conclusion of our results with the model is that the loading status of intracellular stores determines the effective

gain of CICR, regardless of the source of trigger Ca^{2+} . Since it is conceivable that this physiological parameter undergoes cellular control, both globally and locally, it may represent a potentially important mechanism for regulating CICR.

Interaction between neighboring RyRs and calcium stores is intrinsic to common pool models provided that they are sufficiently close to one another so that they respond to each other's released Ca^{2+} . Our model does not specifically consider interactions between release channels. In heart cells, RyRs are organized in discrete release units coupled to single sarcolemmal dihydropyridine channels, but largely uncoupled from neighboring release units, an arrangement that provides high gain but prevents uncontrolled regenerative behavior (Stern, 1992).

In avian heart cells, where excitation-contraction coupling depends on Ca^{2+} diffusion from one release unit to the next one (because of the lack of t-tubules; Sommer et al., 1991), the distance between individual release units and its nearest neighbors is about 135 nm. Presumably this distance allows effective propagation of a wave of Ca^{2+} release between neighboring release units (Protasi and Franzini-Armstrong, 1996). The spatial organization of neuronal intracellular calcium pools and release units is largely unknown (Pozzan et al., 1994). Sympathetic neurons possess abundant ryanodine binding sites (Hernández-Cruz et al., 1995) but lack privileged communication pathways (i.e., t-tubules) between the plasmalemmal voltage-gated Ca^{2+} channels and the majority of their Ca^{2+} release channels. The necessity of using caffeine concentrations close to the half-maximal dose in order to elicit regenerative responses in nerve cells (this study), suggest that overall, the interaction between release channels is limited. It is possible that the distance between neighboring release units does not favor a significant interaction. Alternatively, Ca^{2+} -dependent inactivation and local depletion of releasable Ca^{2+} could extinguish channel activity shortly after it has been initiated by the stimulus. A detailed study on the spatial organization of release units in nerve cells is required to understand the reasons for their apparently limited interaction.

This study suggests that neuronal CICR is designed to favor amplification of Ca^{2+} signals originated from intracellular sources like IP_3 or ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores themselves, rather than amplification of voltage-gated Ca^{2+} influx. The gain of this amplification mechanism may be regulated by the density of RyRs, the filling status of the Ca^{2+} stores and the local concentration of physiological activators of release (Mészáros et al., 1993; Hua et al., 1994). We propose that the primary role of ryanodine-sensitive intracellular stores in nerve cells (and possibly of other nonmuscular cells) is to improve signal to noise ratio by intensifying subcellu-

lar Ca^{2+} gradients generated by agonist-induced intracellular Ca^{2+} release. This local Ca^{2+} signaling function of CICR may be particularly relevant for confined cellular compartments, like synaptic terminals, dendritic spines, or submembrane domains (Verkhatsky and Shmigol, 1996).

APPENDIX

Mathematical Model

To compute Ca^{2+} concentration changes in the different compartments of the nerve cell, the cytosolic space was divided into three regions: an outmost shell (compartment 0; closer to the plasma membrane), a region composed of $n - 1$ intermediate, nonborder compartments, and an inmost shell (compartment n ; closer to the intracellular store membrane). The endoplasmic reticulum was represented by two diffusionally connected compartments, one that takes up Ca^{2+} from the cytosol and another one that releases it into the cytosol.

The net change in Ca^{2+} concentration in any compartment c at all times is given by the difference between Ca^{2+} influx and efflux:

$$\frac{\partial [\text{Ca}^{2+}](t,c)}{\partial t} = J_{\text{in}}(t,c) - J_{\text{out}}(t,c), \quad (\text{A1})$$

where $[\text{Ca}^{2+}](t,c)$ is the Ca^{2+} concentration of compartment c , and $J_{\text{in}}(t,c)$, $J_{\text{out}}(t,c)$ are the net Ca^{2+} influx and efflux into/from compartment c . In general, for an arbitrary compartment c , Ca^{2+} fluxes resulting from diffusion exchange with adjacent compartments, $DF(c)$ and exchange with fixed buffers, $BF(c)$ are given by:

$$DFc = \frac{D_{\text{Ca}}}{dx^2} \{ [\text{Ca}^{2+}](t,c-1) - 2 \cdot [\text{Ca}^{2+}](t,c) + [\text{Ca}^{2+}](t,c+1) \} \quad (\text{A2})$$

and

$$BF(c) = k_{\text{onB}} \cdot [\text{Ca}^{2+}](t,c) \cdot B_{\text{Tot}}(c) + B_{\text{Ca}}(t,c) - k_{\text{offB}} \cdot B_{\text{Ca}}(t,c), \quad (\text{A3})$$

where D_{Ca} is the Ca^{2+} diffusion coefficient and dx the thickness of compartment c , $B_{\text{Tot}}(c)$ and $B_{\text{Ca}}(t,c)$ are total and Ca^{2+} -bound fixed buffers in compartment c , k_{onB} and k_{offB} are association and dissociation rate constants of fixed buffers with Ca^{2+} . The Ca^{2+} pump activity responsible for Ca^{2+} extrusion from compartment 0 through the plasma membrane (Pump_{pm}) and Ca^{2+} removal from compartment n through the ER membrane (Pump_{erm}) is represented as follows:

$$\text{Pump}(\text{Ca}^{2+},t) = \text{Rate}_p \cdot \left[\frac{\text{PUMP}_{\text{Ca}}(t)}{\text{PUMP}_{\text{Tot}}} \right] \cdot ds. \quad (\text{A4})$$

The magnitude of this Ca^{2+} transfer function is given by the pump maximal transfer rate per unit of area, Rate_{p} , multiplied by the fraction of the total number of Ca^{2+} binding regulatory sites which are occupied with Ca^{2+} : $PUMP_Ca(t)/PUMP_{\text{Tot}}$. Here, $PUMP_{\text{Tot}}$ is the total number of Ca^{2+} binding sites and $PUMP_Ca(t)$ the number of sites bound with Ca^{2+} . ds is the area section of plasma or endoplasmic reticulum membrane involved. Occupation with Ca^{2+} of regulatory sites is governed by a first order mass action law:

$$\frac{d[PUMP_Ca](t)}{dt} = k_{\text{onP}} \cdot \{[Ca^{2+}](t) \cdot PUMP_{\text{Tot}} - PUMP_Ca(t)\} - k_{\text{offP}} \cdot \{PUMP_Ca(t)\}, \quad (\text{A5})$$

where k_{onP} and k_{offP} represent association and dissociation rate constants for Ca^{2+} binding, respectively.

$[Ca^{2+}]$ changes in the outmost shell (compartment 0). These changes are given by:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ca^{2+}](t,0)}{\partial t} &= Ca_{\text{Ch}}(t) \cdot \{[Ca^{2+}](t, \text{ext}) \\ &- [Ca^{2+}](t,0)\} - Pump_{\text{pm}}(Ca^{2+}, t) \cdot \{Ca^{2+}\}(t,0) \\ &- DF0 - BF0. \end{aligned} \quad (\text{A6})$$

In this expression, $Ca_{\text{Ch}}(t)$ describes the depolarization-induced opening of a voltage-gated Ca^{2+} conductance, given by:

$$\begin{aligned} Ca_{\text{Ch}}(t) &= Ca_{\text{Chmax}} \left\{ \sum_{i=0}^l [u(t - (i+1)) \cdot Ca_{\text{ChInt}} \right. \\ &- i \cdot Ca_{\text{ChDur}}] - u(t - (i+1)) \cdot Ca_{\text{ChInt}} \\ &\left. - (i+1) \cdot Ca_{\text{ChDur}} \right\} \cdot ds, \end{aligned} \quad (\text{A7})$$

where Ca_{Chmax} is the maximum Ca^{2+} permeability per membrane area unit, Ca_{ChInt} is the time interval between l successive depolarizations, Ca_{ChDur} is the duration of each stimulus, and ds is the plasma membrane section area of compartment 0. $u(t - a)$ is a square pulse Heavyside function defined as follows:

$$\begin{cases} u(t - a) = 0 \Leftrightarrow t < a \\ u(t - a) = 1 \Leftrightarrow t \geq a. \end{cases}$$

Ca^{2+} efflux from the outmost shell (compartment 0) by the plasmalemmal Ca^{2+} pump is given by:

$$Pump_{\text{pm}}(Ca^{2+}, t) = \text{Rate}_{\text{p}} \cdot \frac{PUMP_{\text{pm}} - Ca(t,0)}{PUMP_{\text{pmTot}}} \cdot ds. \quad (\text{A8})$$

Since Ca^{2+} diffusion through the plasma membrane is negligible, the diffusional fluxes of the outmost shell (compartment 0), can be written as follows:

$$DF(0) = \frac{D_{\text{Ca}}}{dx^2} \{ [Ca^{2+}](t,0) - [Ca^{2+}](t,1) \}. \quad (\text{A9})$$

$[Ca^{2+}]$ changes in nonborder shells (compartments 1 to $n-1$). In each of these compartments, Ca^{2+} fluxes due to the opening of Ca^{2+} channels and Ca^{2+} pump activity are absent. Therefore, the changes in Ca^{2+} , are simply given by:

$$\left. \frac{\partial [Ca^{2+}](t,j)}{\partial t} \right]_{j=n-1}^{j=1} = DF(j) - BF(j). \quad (\text{A10})$$

$[Ca^{2+}]$ changes in the inmost shell (compartment n). The Ca^{2+} concentration changes in compartment n can be computed as follows:

$$\begin{aligned} \frac{\partial [Ca^{2+}](t,n)}{\partial t} &= RyR(Ca^{2+}, t) \cdot \{[Ca^{2+}](t, ERt) \\ &- [Ca^{2+}](t,n)\} - Pump_{\text{erm}}(Ca^{2+}, t) \cdot [Ca^{2+}](t,n) \\ &- DF(n) - BF(n). \end{aligned} \quad (\text{A11})$$

The first term represents Ca^{2+} influx due to Ca^{2+} mobilization through RyR release channels. Here, the function $RyR(Ca^{2+}, t)$ represents the macroscopic Ca^{2+} permeability per unit membrane area of the endoplasmic reticulum compartment capable of releasing Ca^{2+} to the cytosol (ERt). Release channels possess three regulatory Ca^{2+} binding sites: two cytosolic sites, which regulate activation and inactivation of the channel, and a third luminal site, which regulates channel conductance. The macroscopic Ca^{2+} permeability of these channels is given by:

$$\begin{aligned} RyR(Ca^{2+}, t) &= RyR_{\text{max}} \cdot \left[\frac{aRyR_Ca(t,n)}{aRyR_{\text{Tot}}} \right] \cdot \\ &\left[1 - \frac{iRyR_Ca(t,n)}{iRyR_{\text{Tot}}} \right] \cdot \left[\frac{lRyR_Ca(t, ERt)}{lRyR_{\text{Tot}}} \right]^N \cdot ds_{\text{erm}}, \end{aligned} \quad (\text{A12})$$

where RyR_{max} is the peak macroscopic permeability per unit of area, $aRyR_Ca(t, n)/aRyR_{\text{Tot}}$ is the fraction of activating sites occupied with Ca^{2+} . Likewise, $iRyR_Ca(t, n)/iRyR_{\text{Tot}}$ is the fraction of inactivating sites occupied with Ca^{2+} , and $lRyR_Ca(t, ERt)/lRyR_{\text{Tot}}$ is the fraction of luminal sites occupied with Ca^{2+} . N is the cooperativity of the luminal regulatory site and ds_{erm} is the area of the section of the ER membrane. These regulatory Ca^{2+} binding sites are occupied with Ca^{2+} according to the law of mass action:

$$\begin{aligned} \frac{d[aRyR_Ca](t,n)}{dt} &= k_{\text{onaRyR}}(C_{\text{aff},t}) \cdot [Ca^{2+}](t,n) \cdot \\ &[aRyR_{\text{Tot}} - aRyR_Ca(t,n)] - k_{\text{offaRyR}} [aRyR_Ca(t,n)], \end{aligned} \quad (\text{A13})$$

$$\begin{aligned} \frac{d[iRyR_Ca](t,n)}{dt} &= k_{\text{oniRyR}} \cdot [Ca^{2+}](t,n) \cdot \\ &[iRyR_{\text{Tot}} - iRyR_Ca(t,n)] - k_{\text{offiRyR}} [iRyR_Ca(t,n)], \end{aligned} \quad (\text{A14})$$

$$\frac{d [lRyR_Ca] (t, ERt)}{dt} = k_{onlRyR} \cdot [Ca^{2+}] (t, ERt) \cdot [lRyR_{Tot} - lRyR_Ca (t, ERt)] - k_{offlRyR} [lRyR_Ca (t, ERt)], \quad (A15)$$

where $k_{onlRyR(caff, t)}$, $k_{offlRyR}$, k_{onlRyR} , $k_{offlRyR}$, k_{onlRyR} , and $k_{offlRyR}$ are the association and dissociation rate constants of cytosolic and luminal regulatory Ca^{2+} binding sites of the release channel. A caffeine dependence has been introduced to the association rate constant of the activating site. This parameter is used to simulate agonist-induced stimulation of the release channel as follows:

$$k_{onlRyR} (Caff, t) = k_{on-Caff} + (k_{on+Caff} - k_{on-Caff}) \cdot \left\{ \sum_{i=0}^m [u (t - (i + 1)) \cdot Caff_{Int} - i \cdot Caff_{Dur}] - u (t - (i + 1)) \cdot Caff_{Int} - (i + 1) \cdot Caff_{Dur} \right\}, \quad (A16)$$

where $k_{on-Caff}$ and $k_{on+Caff}$ are the association rate constants before and after and during caffeine application, respectively. $Caff_{Int}$ is the interval between m caffeine stimuli and $Caff_{Dur}$ is the duration of each caffeine stimulus.

The Ca^{2+} uptake from the inmost shell (compartment n) by the ER Ca^{2+} pump is given by a transfer function similar to that of the plasmalemmal Ca^{2+} pump.

$$Pump_{erm} (Ca^{2+}, t) = Rate_{erm} \cdot \frac{PUMP_{erm-Ca} (t, n)}{PUMP_{erm-Tot}} \cdot ds_{erm}. \quad (A17)$$

Since Ca^{2+} diffusion through the ER membrane is negligible, the diffusional fluxes of the inmost cell (compartment n), can be written as follows:

$$DF(n) = \frac{D_{Ca}}{dx^2} \{ [Ca^{2+}] (t, n) - [Ca^{2+}] (t, n - 1) \}. \quad (A18)$$

Ca²⁺ distribution within the ER compartment. In this model the ER comprises two diffusionally connected compartments. The first one (*ERs*), removes Ca^{2+} from the cytosol by way of the ER Ca^{2+} pump. The second one (*ERT*) releases Ca^{2+} into the cytosol via Ca^{2+} release channels. The change in Ca^{2+} concentration in compartment *ERs* is given by:

$$\frac{\partial [Ca^{2+}] (t, ERs)}{\partial t} = Pump_{erm} (Ca^{2+}, t) \cdot [Ca^{2+}] (t, n) - D_{Ca} \cdot \frac{ds_{ER}^2}{vol_{ER}^2} \cdot \{ [Ca^{2+}] (t, ERs) - [Ca^{2+}] (t, ERT) \}, \quad (A19)$$

where ds_{ER} is the thickness of the ER compartment and vol_{ER} is the volume of each ER compartment, and the change in Ca^{2+} concentration in the ER compartment that releases Ca^{2+} into the cytosol is given by:

$$\frac{\partial [Ca^{2+}] (t, ERT)}{\partial t} = D_{Ca} \cdot \frac{ds_{ER}^2}{vol_{ER}^2} \cdot \{ [Ca^{2+}] (t, ERs) - [Ca^{2+}] (t, ERT) \}$$

$$- RyR (Ca^{2+}, t) \cdot \{ [Ca^{2+}] (t, ERT) - [Ca^{2+}] (t, n) \}. \quad (A20)$$

All equations were numerically integrated using a finite difference approximation (Euler method) with the aid of the Scope 3.5 simulation package.

The authors wish to thank Drs. Agustín Guerrero and Luis Vaca for reviewing an earlier version of this manuscript, Dr. Carlos Sevcik for helpful discussion of numerical methods for integrating parabolic partial differential equations, and Drs. Gonzalo Pizarro and Francisco Sala for many helpful suggestions. We also thank Teresa Santos for preparing and maintaining neuronal cultures.

This work was supported by grants from DGAPA-UNAM (IN212194, IN206395) and CONACyT 400346-5-2366PN (México; A. Hernández-Cruz) and CONICIT (S1-95000493; Venezuela, A.L. Escobar).

Original version received 8 July 1996 and accepted version received 14 November 1996.

REFERENCES

- Adler, E.M., G.J. Augustine, S.N. Duffy, and M.P. Charlton. 1991. Alien intracellular calcium chelators attenuate neurotransmitter release at the squid giant synapse. *J. Neurosci.* 11:1496-1507.
- Akaike, N., and J.-I. Sadoshima. 1989. Caffeine affects four different ionic currents in the bull-frog sympathetic neurone. *J. Physiol. (Lond.)*. 412:221-244.
- Bassani, J.W.M., Y. Weilong, and D.M. Bers. 1995. Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 268:C1313-C1329.
- Berman, M.C., and S.B. King. 1990. Stoichiometries of calcium and strontium transport coupled to ATP and acetyl phosphate hydrolysis by skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1029:235-240.
- Bezprozvanny, I., J. Watras, and B.E. Erlich. 1991. Bell-shaped calcium response curves of Ins(1,4,5)P₃ and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature (Lond.)*. 351:751-754.
- Cannell, M.B., H. Cheng, and W.J. Lederer. 1995. The control of calcium release in heart muscle. *Science (Wash. DC)*. 268:1045-1049.
- Cheek, T.R., M.J. Berridge, R.B. Moreton, K.A. Stauderman, M.M.

- Murawsky, and M.D. Bootman. 1994. Quantal Ca^{2+} mobilization by ryanodine receptors is due to all-or-none release from functionally discrete intracellular stores. *Biochem. J.* 301:879–883.
- Donoso, P., H. Prieto, and C. Hidalgo. 1995. Luminal calcium regulates calcium release in triads isolated from frog and rabbit skeletal muscle. *Biophys. J.* 68:507–515.
- Dryer, S.E., M. Drake, T. D'Souza, and S. Raucher. 1995. Caffeine causes direct blockade of delayed rectifier potassium currents in vertebrate neurons and secretory cells. *Soc. Neurosci. Abstr.* 21:505. (Abstr.).
- Endo, M. 1985. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Curr. Top. Membr. Transp.* 25:181–230.
- Fabiato, A. 1985. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced calcium release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J. Gen. Physiol.* 85:247–289.
- Fabiato, A. 1992. Two kinds of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells. In *Excitation-contraction Coupling in Skeletal, Cardiac and Smooth Muscle*. G.B.G. Frank, P. Bianchi, and H. Keurs, editors. Plenum Press, New York. 245–263.
- Favre, C.J., J. Schrenzel, J. Jaquet, D.P. Lew, and K.-H. Krause. 1996. Highly supralinear feedback inhibition of Ca^{2+} uptake by the Ca^{2+} load of intracellular stores. *J. Biol. Chem.* 271:14925–14930.
- Friel, D.D., and R.W. Tsien. 1992. A caffeine and ryanodine-sensitive Ca^{2+} -store in bullfrog sympathetic neurons modulates effects of Ca^{2+} entry on $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *J. Physiol. (Lond.)*. 430:217–246.
- Gonzalez, C.E., L. Granados, A. Cárabez, and A. Hernández-Cruz. 1996. Bodipy FL-X ryanodine labeling of ryanodine receptor channels in rat sympathetic neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:340. (Abstr.).
- Grégoire, G., G. Loirand, and P. Pacaud. 1993. Ca^{2+} and Sr^{2+} entry induced Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store in smooth muscle cells of rat portal vein. *J. Physiol. (Lond.)*. 474:483–500.
- Guerrero, A., F.S. Fay, and J.J. Singer. 1994. Caffeine activates a Ca^{2+} permeable nonselective cation channel in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* 104:375–394.
- Györke, I., and S. Györke. 1996. Adaptive control of intracellular Ca^{2+} release in C2C12 mouse myotubes. *Pflüg. Arch.* 431:838–843.
- Györke, S., and M. Fill. 1993. Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in heart. *Science (Wash. DC)*. 260:807–809.
- Györke, S., and P. Palade. 1994. Ca^{2+} -dependent negative control mechanism for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in crayfish muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 476:315–322.
- Hagiwara, S., and H. Ohmori, 1982. Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with patch electrode voltage clamp. *J. Physiol. (Lond.)*. 331:231–252.
- Hernández-Cruz, A., M. Díaz-Muñoz, M. Gómez-Chavarín, R. Cañedo-Merino, D.A. Protti, A.L. Escobar, J. Sierralta, and B.A. Suárez-Isla. 1995. Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced Ca^{2+} mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7:1684–1699.
- Hernández-Cruz, A., F. Sala, and P.R. Adams. 1990. Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science (Wash. DC)*. 247:858–862.
- Hille, B. 1992. *Ionic Channels in Excitable Membranes*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland MA. 261–290.
- Hua, S.Y., T. Tokimasa, S. Takasawa, Y. Furuya, M. Nohmi, H. Okamoto, and K. Kuba. 1994. Cyclic-ADP-ribose modulates Ca^{2+} release channels for activation by physiological Ca^{2+} entry in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*. 12:1073–1079.
- Iino M., and M. Endo. 1992. Calcium-dependent immediate feedback control of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} -release. *Nature (Lond.)*. 360:76–78.
- Ivanenko, A., M.D. Baring, J.A. Airey, J.L. Sutko, and J.L. Kenyon. 1993. A caffeine and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in avian sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 70:710–722.
- Jacquemond, V., L. Csernoch, M.G. Klein, and M.F. Scheider. 1991. Voltage-gated and calcium-gated calcium release during depolarization of skeletal muscle fibers. *Biophys. J.* 60:867–874.
- Kao, J.P.Y., and R.Y. Tsien. 1988. Ca^{2+} binding kinetics of fura-2 and azo-1 from temperature-jump relaxation measurements. *Biophys. J.* 53:635–639.
- Kawai, T., and M. Watanabe. 1989. Effects of ryanodine on the spike after-hyperpolarization in sympathetic neurones of the rat superior cervical ganglion. *Pflüg. Arch.* 413:470–475.
- Konishi, M., A. Olson, S. Hollingworth, and S.M. Baylor. 1988. Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.* 54:1089–1104.
- Kostyuk, P., and A. Verkhratsky. 1994. Calcium stores in neurons and glia. *Neurosci.* 63:381–404.
- Kuba, K. 1994. Ca^{2+} induced Ca^{2+} release in neurons. *Jpn. J. Physiol.* 44:613–650.
- Kuba, K., S.-Y. Hua, and T. Hayashi. 1994. A UV laser-scanning confocal microscope for the measurement of intracellular Ca^{2+} . *Cell Calcium*. 16:205–218.
- Kwan, C., and J.W. Putney. 1990. Uptake and intracellular sequestration of divalent cations in resting and methacholine-stimulated lachrymal acinar cells. *J. Biol. Chem.* 265:678–684.
- Llano, I., R. DiPolo, and A. Marty. 1994. Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje neurons. *Neuron*. 12:663–673.
- Meissner, G. 1994. Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56:485–508.
- Mészáros, L., J. Bak, and A. Chu. 1993. Cyclic-ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Nature (Lond.)*. 364:76–79.
- McPherson, P.S., and K.P. Campbell. 1993. Characterization of the major brain form of the ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 268:19785–19790.
- Nohmi, M., S.-Y. Hua, and K. Kuba. 1992. Intracellular calcium dynamics in response to action potentials in bullfrog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 458:171–190.
- Oberhauser, A., O. Alvarez, and R. Latorre. 1988. Activation by divalent cations of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel from skeletal muscle membrane. *J. Gen. Physiol.* 92:67–86.
- O'Neill, S.C., P. Donoso, and D.A. Eisner. 1990. The role of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and $[\text{Ca}^{2+}]_o$ sensitization in the caffeine contracture of rat myocytes: Measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and [caffeine]. *J. Physiol. (Lond.)*. 425:55–70.
- Pessah, I.N., and I. Zimanyi. 1991. Characterization of multiple $[\text{H}^3]$ ryanodine binding sites on the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Mol. Pharmacol.* 39:679–689.
- Pizarro, G., L. Csernoch, I. Uribe, and E. Ríos. 1992. Different effects of tetracaine on two kinetic components of calcium release in frog skeletal muscle fibers. *J. Physiol. (Lond.)*. 457:525–538.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Medolesi. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74:595–636.
- Protasi, F., and C. Franzini-Armstrong 1996. Significance of the distance between calcium release units in cardiac and skeletal muscle. *Biophys. J.* 70:245a.
- Rasgado-Flores, H., S. Sánchez-Armass, M.P. Blaunstein, and D.A. Nachshen. 1987. Strontium, barium and manganese metabolism in isolated presynaptic nerve terminals. *Am. J. Physiol.* 252:C604–

- C610.
- Russeau, E., J.S. Smith, and G. Meissner. 1987. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol.* 253:C364–C368.
- Sah, P., and E.M. McLachlan. 1991. Ca^{2+} -activated K^+ currents underlying the afterhyperpolarization in guinea pig vagal neurons: a role for Ca^{2+} -activated Ca^{2+} release. *Neuron*. 7:257–264.
- Schneider, M., and B.J. Simon. 1988. Inactivation of calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 405:727–745.
- Sham, J.S.K., L. Cleemann, and M. Morad. 1995. Functional coupling of Ca^{2+} channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:121–125.
- Shmigol, A., S. Kirischuk, P. Kostyuk, and A. Verkhratsky. 1994. Different properties of caffeine-sensitive Ca^{2+} stores in peripheral and central mammalian neurones. *Pflüg. Arch.* 426:174–176.
- Shmigol, A., N. Svichar, P. Kostyuk, and A. Verkhratsky. 1996. Gradual caffeine-induced Ca^{2+} release in mouse dorsal root ganglion neurons is controlled by cytoplasmic and luminal Ca^{2+} . *Neuroscience*. 73:1061–1067.
- Shmigol, A., A. Verkhratsky, and G. Isengerb. 1995. Calcium-induced calcium release in rat sensory neurons. *J. Physiol. (Lond.)*. 489: 627–636.
- Sitsapesan, R., and A.J. Williams. 1990. Mechanisms of caffeine activation of single calcium release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol. (Lond.)*. 423:425–439.
- Sitsapesan, R., and A.J. Williams. 1994. Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel by luminal Ca^{2+} . *J. Membr. Biol.* 137:215–226.
- Sommer, J.R., E. Bossen, and R. Nassar. 1991. Avian extended JSR (EJSR): a challenge to direct contact signal transduction (DCT) for coupling excitation to calcium-release (ECR) in cardiac muscle. *Physiologist*. 34:109.
- Stern, M.D. 1992. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys. J.* 63:497–517.
- Stern, M.D. 1996. “Adaptive” behavior of ligand-gated ion channels: constraints by thermodynamics. *Biophys. J.* 70:2100–2109.
- Sugiyama, K., and T. Muteki. 1994. Local anesthetics depress the calcium current of rat sensory neurons in culture. *Anesthesiology*. 80:1369–1378.
- Tang, Y., and H.S. Othmer. 1994. A model of calcium dynamics in cardiac myocytes based on the kinetics of ryanodine-sensitive calcium channels. *Biophys. J.* 67:2223–2235.
- Thayer, S.A., L.D. Hirning, and R.J. Miller. 1988. The role of caffeine-sensitive calcium stores in the regulation of intracellular free calcium concentration in rat sympathetic neurons in vitro. *Mol. Pharmacol.* 34:664–673.
- Thayer, S.A., and R.J. Miller. 1990. Regulation of the intracellular calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J. Physiol. (Lond.)*. 425:85–115.
- Tillotson, D. 1979. Inactivation of Ca conductance dependent on entry of Ca ions in molluscan neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:1497–1500.
- Tripathy, A., and G. Meissner. 1996. Sarcoplasmic reticulum luminal Ca^{2+} has access to cytosolic activation and inactivation sites of skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *Biophys. J.* 70:2600–2615.
- Uneyama, H., M. Munakata, and N. Akaike. 1993. Caffeine response in pyramidal neurons freshly dissociated from rat hippocampus. *Brain Res.* 604:24–31.
- Usachev, Y., N. Shmigol, N. Pronchock, P. Kostyuk, and A. Verkhratsky. 1993. Caffeine-induced calcium release from internal stores in cultured rat sensory neurons. *Neuroscience*. 57:845–859.
- Vélez, P., and B.A. Suárez-Isla. 1992. Intraluminal Ca^{2+} sites regulate the sarcoplasmic reticulum (SR) channel. *Biophys. J.* 61:430a.
- Verkhratsky, A., and A. Shmigol. 1996. Calcium-induced calcium release in neurones. *Cell Calcium*. 19:1–14.
- Watanabe, H., and G. Burnstock. 1976. Junctional subsurface organs in frog sympathetic ganglion cells. *J. Neurocytol.* 5:125–136.
- Wier, W.G. 1990. Cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in mammalian ventricle: dynamic control by cellular processes. *Annu. Rev. Physiol.* 52:467–488.
- Williams, A.J. 1992. Ion conduction and discrimination in the sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor/calcium release channel. *J. Musc. Res. Cell Motil.* 13:7–26.
- Xu, L., R. Jones, and G. Meissner. 1993. Effects of local anesthetics on single channel behavior of skeletal muscle calcium release channel. *J. Gen. Physiol.* 101:207–233.
- Yoshizaki, K., T. Hoshino, M. Sato, H. Koyano, M. Nohmi, S.-Y. Hua, and K. Kuba. 1995. Ca^{2+} induced Ca^{2+} release and its activation in response to a single action potential in rabbit otic ganglion cells. *J. Physiol. (Lond.)*. 486:177–187.