

Un laberinto entre canales: la investigación en un pequeño laboratorio de España.

Almudena Albillos Martínez

Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

Al cumplirse los 20 años de AFT, comparto contigo esta historia sobre mi trabajo que escribo por invitación de Antonio García, una persona entrañable, sin cuya confianza, enseñanzas y afecto, no te la estaría narrando hoy aquí. La dedico a los que se asoman ahora al mundo de la ciencia, y a todos los que han formado parte de este relato; a los estudiantes que invirtieron su tiempo y su esfuerzo en mi laboratorio; a mis compañeros, cuya presencia silenciosa ha enriquecido mi vida, y cuyo recuerdo me evoca ternura por habernos acompañado durante décadas; a mi familia y amigos, que me han dado la energía que mueve y sostiene todo. A ti lector, por si esta historia inspira a tu espíritu hacia una carrera investigadora, si por el contrario te lleva a desterrar esa idea para siempre, o si te sirve para adentrarte en la vida de un laboratorio pequeño que ha contribuido de alguna manera a la Ciencia y a la formación de científicos en España.

Octubre 1991, Turín. Emilio Carbone y su colaboradora Antonella Pollo me recogían en el aeropuerto, donde nos encontrábamos por primera vez. Inmediatamente me comentaron que acababan de conceder el premio Nobel de Medicina a Erwin Neher y Bert Sackmann por el desarrollo de la técnica de “patch-clamp”, que permitía la detección de las corrientes iónicas que fluyen por un único canal. Yo aterrizaba en Turín precisamente para aprender esa técnica en el laboratorio de Emilio. Pronto me sumergí en el mundo de los canales iónicos, registrando corrientes iónicas en células β -pancreáticas fundamentalmente. Y así, en un mundo entre canales, y próxima a la ciudad con canales más icónica del mundo, el primer fin de semana que pude decidí coger mi mochila e ir a Venecia. Entraba al alba por el Gran Canal, cuando el sol se levantaba por encima de la Basílica de La Salute. Hacía bruma y frío, y entre palacios y góndolas, sentí una gran emoción, la misma que me invadió la primera vez que registré una corriente de calcio en mi nuevo laboratorio. A mi regreso a España después de tres meses, y con la colaboración de Emilio Carbone, y de Luis Gandía que entonces se encontraba en EEUU pero que pronto volvería a nuestro departamento, pusimos en marcha varios equipos de “patch-clamp” en el laboratorio. Caracterizamos los canales de calcio en diversas especies con la ayuda

de las dihidropiridinas (bloqueantes del canal de calcio tipo L), y las ω -conotoxinas, extraídas por el equipo de Baldomero Olivera en la Universidad de Utah de caracoles marinos engullidores de peces, que utilizaban su veneno para paralizar a su presa bloqueando, entre otros, canales de calcio del tipo no-L. Era una época en la que el estudio de los canales de calcio se encontraba en su máxima ebullición, y se describieron nuevos tipos (N, P/Q, R) y funciones para ellos. Nosotros contribuimos a ese conocimiento utilizando las células cromafines de la glándula adrenal, una célula neuroendocrina que libera grandes cantidades de adrenalina en situación de estrés, además de opioides, calcio, ATP y otros muchos compuestos. Se sabía que el calcio es imprescindible para la liberación exocitótica de neurotransmisor al torrente sanguíneo. Nuestro objetivo era dilucidar qué tipos de canales de calcio permiten la entrada de este catión al citosol celular para regular procesos dependientes del calcio, entre ellos la exocitosis de neurotransmisores. Así, caracterizamos los tipos de canales de calcio en las células cromafines de distintas especies animales, incluido el hombre, desde un punto de vista funcional y molecular, y de ese estudio comparativo pudimos aprender que la proporción de canales en todas ellas es distinta, y que su acoplamiento al proceso de exocitosis también lo es, estudios que hemos continuado en los

últimos años. Así mismo, investigamos el mecanismo de acción sobre dichos canales de distintos fármacos (dotarizina, flunarizina, pregabalina) utilizados para el dolor. Estos canales de calcio además podían regularse por los compuestos que libera la propia célula (ATP, opioides, adrenalina) a través de un mecanismo acoplado a proteínas G, reduciendo la entrada de calcio y la liberación de neurotransmisor. Esta regulación está alterada en el feocromocitoma, un tumor poco frecuente de la glándula adrenal en el que se produce la liberación masiva de neurotransmisor.

Ya en 1995, en Sevilla, Guillermo Álvarez de Toledo medía la liberación de neurotransmisores capaces de ser oxidados (como la adrenalina) de una célula única, por medio de la técnica de amperometría utilizando fibras de carbono fabricadas por él. Fui a su laboratorio a aprender dicha técnica puesto que estábamos centrados en el estudio de la secreción de estos compuestos. Guillermo y Eva Alés me la enseñaron, en un ambiente científico de excelencia dentro del departamento de Fisiología Médica y Biofísica dirigido por José López-Barneo. Fue una época hermosa, con la llegada de la primavera, la alegría en las calles y el olor a azahar. Allí Guillermo me propuso ir a Heidelberg (Alemania) con Manfred Lindau para trabajar en un proyecto muy ambicioso que tenían entre manos: el desarrollo de la técnica de amperometría en parche. Por medio de esta técnica sería posible determinar la fusión de una única vesícula secretora con la membrana plasmática, la liberación de su contenido de neurotransmisor al exterior, y la conductancia del poro de fusión que se origina para que se libere dicho transmisor. Para ello había que introducir la fibra de carbono en la pipeta de "patch", utilizando un soporte de pipetas que Manfred y Guillermo habían diseñado con este fin, y un amplificador Lockin que nos permitiría detectar todas las señales con resolución muy elevada. La misión no parecía fácil, pero yo llegaba a Heidelberg en junio de 1996 rebosante de energía e ilusiones. De nuevo, la atmósfera científica te hacían olvidar lo que dejabas atrás, y ese ambiente me acompañó durante los 15 meses que permanecí allí, en el Instituto Max-Planck de Investigación Médica, en el Departamento de Investigación Celular y Molecular dirigido por Wolfhard Almers. El laboratorio de Bert Sackmann formaba parte del Instituto, y realizábamos seminarios conjuntos muy estimulantes, en los que discutíamos con pasión nuestros hallazgos más recientes. En nuestro trabajo, obtuvimos que en la mayoría de los casos el poro de fusión que se forma al fusionarse la vesícula con la membrana plasmática dejaba salir el contenido de neurotransmisor primero a través de una pequeña apertura de reducida conductancia, y luego de forma

total al expandirse completamente. Sin embargo, en algunos eventos el poro podía abrirse de forma transitoria y volver a cerrarse, mediante un proceso denominado "kiss and run", que supone un gran ahorro energético para la célula al poder liberar su contenido y recargarse nuevamente de él sin tener que retornar al trans-Golgi.

Pero todo llega a su fin, y Manfred tuvo que partir a Ithaca (Nueva York) al finalizar su contrato en el Max-Planck. Yo me trasladé a Goettingen al laboratorio de Erwin Neher (Instituto Max-Planck de Biofísica Química, Departamento de Biofísica de Membranas), para continuar formándome en las técnicas de electrofisiología. En el laboratorio de Erwin, junto con Tobías Moser, caracterizamos los canales de calcio y la exocitosis en rodajas de tejido de la glándula adrenal de ratón. Era un paso adicional hacia el conocimiento más fisiológico de la situación *in vivo*, pues todo mi trabajo anterior lo había realizado siempre en células aisladas y mantenidas en cultivo, pudiendo verse alterada su fisiología en este aislamiento. El hallazgo fundamental fue describir la presencia de un canal R funcional acoplado al componente rápido de exocitosis en esas células.

A mi regreso a España, y continuando con la línea general de estudio de la homeostasia celular del calcio, en el laboratorio de Antonio García indagamos la contribución de las organelas intracelulares (mitocondria, retículo endoplásmico y vesícula secretora) al proceso de la secreción de neurotransmisores. En colaboración con el grupo de Javier Álvarez de Valladolid pudimos describir cómo la mitocondria es capaz de almacenar concentraciones de calcio en el orden de milimolar, controlando así la secreción. Además, en relación a este tema y ya más recientemente en mi laboratorio hemos podido investigar también, la función de los receptores de IP_3 del retículo endoplásmico y las vesículas secretoras tras la estimulación colinérgica muscarínica en la exocitosis y liberación de catecolaminas, estudio que está en vías de ser publicado. En él concluimos que el IP_3 contribuye al proceso de secreción de neurotransmisores de forma exocitótica y no exocitótica.

Desde el año 2006 centramos la investigación en mi laboratorio en el estudio de la estimulación colinérgica nicotínica, caracterizando funcional y molecularmente los dos tipos de receptores nicotínicos fundamentalmente expresados en la célula cromafín humana, el $\alpha 7$ y el $\alpha 3\beta 4$, mediante, una vez más, toxinas de caracoles marinos o derivados sintéticos de ellas. En este caso se trata de α -conotoxinas, cedidas

por James M. Macintosh de la Universidad de Utah. El estudio en células cromafines de la glándula adrenal humana que hemos llevado a cabo durante 15 años ha sido posible gracias a la colaboración desinteresada de médicos urólogos y coordinadores de trasplantes de numerosos hospitales de Madrid. Una colaboración que costó mucho esfuerzo instaurar y que ha sido posible también gracias a la gran dedicación de los estudiantes del laboratorio, que podían ser avisados del trasplante de órganos todos los días de la semana a cualquier hora. Así describimos que la entrada de calcio por estos receptores puede contribuir a la excitación tanto como el calcio que entra por los canales de calcio dependientes de voltaje. Además hemos descrito la interacción física y funcional entre los dos tipos de receptores principalmente expresados, que permite que al ser activados simultáneamente con la máxima eficacia por la acetilcolina no se desensibilicen, a diferencia de la enorme desensibilización que experimenta el tipo $\alpha 7$ cuando se activa solo en un sistema heterólogo, o conjuntamente con la activación parcial del $\alpha 3\beta 4$ en un sistema nativo, como se había descrito hasta el momento. Además, investigamos la vareniclina, un fármaco agonista de receptores nicotínicos de primera elección para dejar de fumar, y mostramos que disparaba potenciales de acción y la secreción de adrenalina en la célula cromafín humana. En la actualidad, hemos comenzado a evaluar la interacción física y funcional antes descrita de los receptores nicotínicos en el Alzheimer, que se ve alterada en las neuronas de hipocampo, lo cual podría explicar en parte la pérdida de actividad colinérgica existente en esta patología.

Hace unos meses volví a Venecia y me siguió causando una profunda emoción. Me pareció aún más hermosa que la primera vez, no porque hubiera cambiado, sino porque yo ya no era la misma. Es verdad que la perspectiva nos hace ver el mundo de otro modo, y hoy percibo el laberinto vivido como algo apasionante, que ha merecido la pena recorrerlo, encontrar la salida y seguir adelante. Como seguiré haciéndolo pese a la multitud de obstáculos. Es una lástima que las prioridades de los líderes políticos del mundo actual no sean las de los ciudadanos, que no desean que las numerosas barreras para avanzar en el mundo de la Ciencia esté dejando a nuestra Universidad desprovista de jóvenes, del futuro que nosotros sembramos al formarlos, y que otros recogen.

PÍLDORA DE INFORMACIÓN

RIESGO ABSOLUTO

El riesgo absoluto mide el riesgo de que una persona o un grupo de personas padezcan una enfermedad durante un determinado periodo de tiempo. También se utiliza como indicador sobre la reducción de ese riesgo con el tratamiento farmacológico de un paciente o grupo de pacientes. Por ejemplo, el riesgo absoluto puede ser de un 10% (o de 0,1) si ese riesgo afecta a 1 de cada 10 personas. El riesgo absoluto no compara riesgos entre, grupos de personas; esto lo hace el riesgo relativo.