



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

**CANALES DE CALCIO DE TIPO  $Ca_v1$  EN LA CÉLULA CROMAFÍN  
DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATÓN Y HUMANA:  
PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y FUNCIÓN EN LA EXCITABILIDAD  
CELULAR Y EXOCITOSIS**

Trabajo presentado para optar al Título de Doctor por la Universidad Autónoma de  
Madrid presentado por

**ALICIA HERNÁNDEZ VIVANCO**

Directora: Dra. María Almudena Albillos Martínez

Madrid, 2013



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

Dra. MARÍA ALMUDENA ALBILLOS MARTÍNEZ, Profesora Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA, que Doña Alicia Hernández Vivanco, ha realizado bajo su dirección el presente trabajo: CANALES DE CALCIO DE TIPO  $Ca_v1$  EN LA CÉLULA CROMAFÍN DE LA GLÁNDULA ADRENAL DE RATÓN Y HUMANA: PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y FUNCIÓN EN LA EXCITABILIDAD CELULAR Y EXOCITOSIS, como Tesis para alcanzar el grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Para que conste a efectos oportunos, expide y firma la presente en Madrid a 13 de mayo de 2013.

Dra. María Almudena Albillos Martínez  
Profesora Titular del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la  
Universidad Autónoma de Madrid

## INDICE

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	1
<b>MARCO DE LA TESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>1. LA GLÁNDULA ADRENAL</b>	6
1.1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA Y MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA ADRENAL	
1.1.1. La corteza	
1.1.2. La médula	
1.2. INERVACIÓN DE LA GLÁNDULA ADRENAL	
1.3. IRRIGACIÓN DE LA GLÁNDULA ADRENAL	
1.4. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA GLÁNDULA ADRENAL	
<b>2. VENTAJAS DE LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR: EL TÉRMINO PARANEURONA</b>	18
2.1. APLICACIONES CLÍNICAS	
<b>3. EL PROCESO SECRETOR DE CATECOLAMINAS</b>	24
3.1. ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN: PAPEL DEL CALCIO	
3.2. SEÑALES DE CALCIO EN LA CÉLULA CROMAFÍN	
3.3. EL PROCESO DE EXOCITOSIS	
<b>4. CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA EXCITABILIDAD DE LA CÉLULA CROMAFÍN</b>	30
4.1. CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR VOLTAJE	
<b>5. LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE</b>	32
5.1. ESTRUCTURA	
5.2. CLASIFICACIÓN	
5.2.1. Canales Ca <sub>v</sub> 1 (L)	
5.2.1.1. Farmacología de los canales Ca <sub>v</sub> 1	
5.2.1.2. Inactivación de los canales Ca <sub>v</sub> 1	
5.2.2. Canales Ca <sub>v</sub> 2 (no-L)	
5.2.2.1. Farmacología de la subfamilia Ca <sub>v</sub> 2	
5.2.3. Canales Ca <sub>v</sub> 3 (T)	
5.2.3.1. Farmacología de la subfamilia Ca <sub>v</sub> 3	
5.3. SUBTIPOS DE CANALES DE CALCIO EN LA CÉLULA CROMAFÍN	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	50
<b>1. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN</b>	51
1.1. Obtención de los animales transgénicos	
1.2. Procedimiento de aislamiento y cultivo de las células cromafines de ratón	
<b>2. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES HUMANAS</b>	52
2.1. Obtención de las glándulas adrenales humanas	
2.2. Procedimiento de aislamiento y cultivo de las células cromafines humanas	

<b>3. MEDIDA DE LAS CORRIENTES IÓNICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PATCH-CLAMP</b>	55
3.1.La técnica de "patch-clamp"	
3.2.Registros electrofisiológicos en parche perforado	
3.3.Soluciones empleadas	
<b>4. INMUNOCITOQUÍMICA EN CÉLULAS CROMAFINES PARA LAS SUBUNIDADES Ca<sub>v</sub>1.1, Ca<sub>v</sub>1.2, Ca<sub>v</sub>1.3, Y Ca<sub>v</sub>1.4</b>	62
<b>5. ANALISIS DE DATOS</b>	62
<b>RESULTADOS</b>	64
<b>PARTE I. EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN</b>	66
<b>RESULTADOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN</b>	67
1. Los canales Ca <sub>v</sub> 1.2 y Ca <sub>v</sub> 1.3 son los subtipos de canales Ca <sub>v</sub> 1 expresados en las células cromafines de ratón.	
2. La supresión del canal del subtipo Ca <sub>v</sub> 1.3 es compensada por el incremento de la expresión de los canales del subtipo Ca <sub>v</sub> 2.2	
3. Los canales Ca <sub>v</sub> 1.3 se activan a potenciales de membrana más negativos que los canales Ca <sub>v</sub> 1.2	
4. Los canales Ca <sub>v</sub> 1.2 se inactivan más rápido que los canales Ca <sub>v</sub> 1.3	
5. Los subtipos de canal Ca <sub>v</sub> 1.2 y Ca <sub>v</sub> 1.3 funcionalmente están acoplados a los canales BK	
6. Los canales Ca <sub>v</sub> 1.2 controlan el disparo de los PAs	
7. Los canales Ca <sub>v</sub> 1.3 son los que contribuyen principalmente a la carga de Ca <sup>2+</sup> y a la exocitosis de vesículas cromafines a potenciales de membrana negativos, mientras que los canales Ca <sub>v</sub> 1.2 contribuyen a potenciales más positivos	
<b>DISCUSIÓN DE LOS EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN</b>	88
<b>CONCLUSIONES DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EN RATÓN</b>	92
<b>PARTE II. EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE HUMANO</b>	93
<b>RESULTADOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE HUMANO</b>	94
1. Los canales Ca <sub>v</sub> 1.2 y Ca <sub>v</sub> 1.3 conforman la corriente Ca <sub>v</sub> 1 en las células cromafines de humano.	
2. Aislamiento de los canales Ca <sub>v</sub> 1 con el cóctel de bloqueantes de CCDV	
3. Dependencia del voltaje de los canales Ca <sub>v</sub> 1	
4. Los canales Ca <sub>v</sub> 1 no contribuyen al disparo de PAs espontáneos y pueden ser activados al utilizar un único PA como estímulo	
5. Los canales del tipo Ca <sub>v</sub> 1 y no-Ca <sub>v</sub> 1 activados por PAs simples se abren a una velocidad similar y muestran una eficiencia análoga.	
6. Los canales Ca <sub>v</sub> 1 nativos humanos están acoplados a los canales BK	
7. Los canales nativos Ca <sub>v</sub> 1 humanos están funcionalmente colocalizados con la	

maquinaria de exocitosis	
8. La contribución relativa de los canales $Ca_v1$ a la corriente total de $Ca^{2+}$ es similar a potenciales hiperpolarizados o más despolarizados	
9. Los canales nativos humanos de tipo $Ca_v1$ se bloquean de forma idéntica por nifedipino e isradipino	
<b>DISCUSIÓN DE LOS EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE HUMANO</b>	109
<b>CONCLUSIONES DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EN LAS CÉLULAS HUMANAS</b>	114
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	116
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	160

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	
Apa	Apamina
Ca <sup>2+</sup>	Catión calcio
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
ChTx	Charibdotoxina
C <sub>m</sub>	Capacidad de la membrana
DBH	Dopamina β-hidroxilasa
DHP	Dihidropiridina
HEPES	(N-[2-hidroxietil]-piperacino-N´-[2-ácido etanosulfónico])
Nife	Nifedipino
NPY	Neuropéptido Y
PA	Potencial de acción
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa
SNX	SNX-482
TEA	Cloruro de tetraetilamonio
TH	Tirosina hidroxilasa
TTX	Tetrodotoxina
Tuboc	D-Tubocurarina
V <sub>h</sub>	Potencial de fijación
V <sub>m</sub>	Potencial de membrana
ω-Aga-IVA	ω-agatoxina IVA
ω-CTX-GVIA	ω-conotoxina GVIA
ω-CTX-MVIIC	ω-conotoxina MVIIC

## **MARCO DE LA TESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## **MARCO DE LA TESIS**

El trabajo presentado en esta Tesis doctoral se ha realizado en el laboratorio de la Dra. Almudena Albillos Martínez en el Departamento de Farmacología y Terapéutica de la Universidad Autónoma de Madrid. Desde que entré a formar parte de este laboratorio he podido trabajar con células cromafines de diferentes especies animales como el ratón, la rata, la vaca, el mono, e incluso el humano, pero ha sido el incremento de colaboraciones con diferentes hospitales de Madrid lo que nos ha permitido conseguir un mayor número de glándulas suprarrenales humanas y centrar gran parte de nuestras investigaciones en el conocimiento de la fisiología de la célula cromafín de la glándula adrenal humana. Hemos trabajado en la caracterización de los receptores nicotínicos humanos, en la identificación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) y en el estudio de las propiedades biofísicas y función en la excitabilidad celular y exocitosis en estas células. Por ello, la presente Tesis resume la investigación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por los CCDV del subtipo  $\text{Ca}_v1$ , para conocer su papel en la excitabilidad de la célula y en la exocitosis en la célula cromafín de la glándula adrenal de ratón y de humano, un tema con importantes aplicaciones clínicas.

## **JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

De los diferentes tipos de CCDV que existen en las células, los canales del tipo  $\text{Ca}_v1$  han sido los más estudiados por suponer una diana terapéutica para enfermedades tan comunes como la angina de pecho, las arritmias cardíacas o la hipertensión.

Los experimentos descritos en esta Tesis nos permitieron clarificar algunas de las características biofísicas y funcionales de estos canales en las células cromafines de ratón y humano, a la vez que nos permitieron estudiar el bloqueo de las dihidropiridinas (DHPs) sobre las corrientes nativas de tipo  $\text{Ca}_v1$  en células humanas.



Los estudios realizados en la célula cromafín humana son muy limitados en comparación a otras especies, debido en gran parte a la dificultad a la hora de obtener tejido humano. Por eso, es de gran importancia la realización de los experimentos sobre canales nativos detallados a continuación, ya que los resultados podrán tener mayor relevancia clínica que los obtenidos en otras especies.

## **OBJETIVOS**

Nos planteamos en diferentes etapas u objetivos caracterizar:

- **Objetivo 1.** Los diferentes subtipos de canales de tipo  $Ca_v1$  expresados en las células cromafines de ratón.
- **Objetivo 2.** Las propiedades biofísicas y de la función del subtipo  $Ca_v1$  en la excitabilidad y en la exocitosis de la célula cromafín de ratón.
- **Objetivo 3.** Los diferentes subtipos de canales de tipo  $Ca_v1$  expresados en las células cromafines humanas.
- **Objetivo 4.** El papel de los canales del tipo  $Ca_v1$  nativos en la excitabilidad de la célula y en la exocitosis en las células cromafines humanas.
- **Objetivo 5.** Las características del efecto de las DHPs sobre los canales  $Ca_v1$  nativos en las células cromafines humanas.

## **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

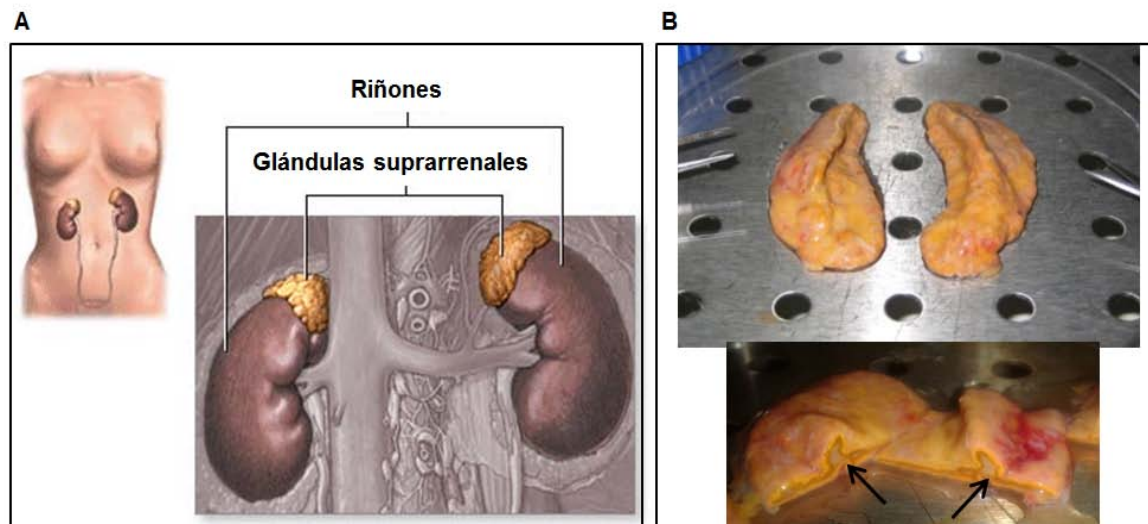
### 1. LA GLÁNDULA ADRENAL

La supervivencia de un individuo depende en gran medida de la liberación al torrente sanguíneo de adrenalina y noradrenalina, dos hormonas que desencadenan de forma casi inmediata una respuesta de “lucha o huída” ante un estímulo estresante. Estas hormonas se sintetizan y liberan por neuronas postganglionares simpáticas y por un grupo de células neuroendocrinas de la **glándula adrenal** conocidas como **células cromafines**. Cuando el cerebro interpreta una situación como alarmante pone en marcha la rama simpática del sistema nervioso autónomo. Uno de sus componentes es la **médula** de la glándula adrenal, que se encarga de liberar a la sangre grandes cantidades de adrenalina que se distribuyen rápidamente por todo el cuerpo. Su función es la de preparar al organismo para la acción: los bronquios y las pupilas se dilatan, hay una vasodilatación periférica para aportar más sangre oxigenada a los músculos, y también una vasoconstricción en las vísceras donde se puede pasar con un pequeño aporte de sangre mientras dure la situación de alarma; la adrenalina tiene efectos inotrópicos positivos sobre el corazón y estimula la glucogenolisis en el hígado y los músculos, además de incrementar la capacidad de atención. Sin embargo un exceso de adrenalina circulante puede llegar a producir arritmia cardíaca, por lo que se requiere una estricta regulación de las catecolaminas circulantes. Esta es la responsabilidad del eje simpatoadrenal.

Las **células cromafines** se ubican principalmente en la médula de la glándula adrenal, que está considerada como un ganglio simpático modificado cuyas neuronas postsinápticas han perdido sus axones y se han convertido en células secretoras; en lugar de inervar un tejido y liberar neurotransmisores localmente en éste, vierten sus productos de secreción al torrente sanguíneo tras recibir un estímulo adecuado, por lo que sus neurotransmisores se comportan como hormonas. Por tanto, la célula cromafín constituye un excelente modelo para el estudio de fenómenos tales como son la síntesis, el almacenamiento y la liberación por excitosis de neurotransmisores (más adelante se explicarán las características que la convierten en tan buen modelo neurosecretor).

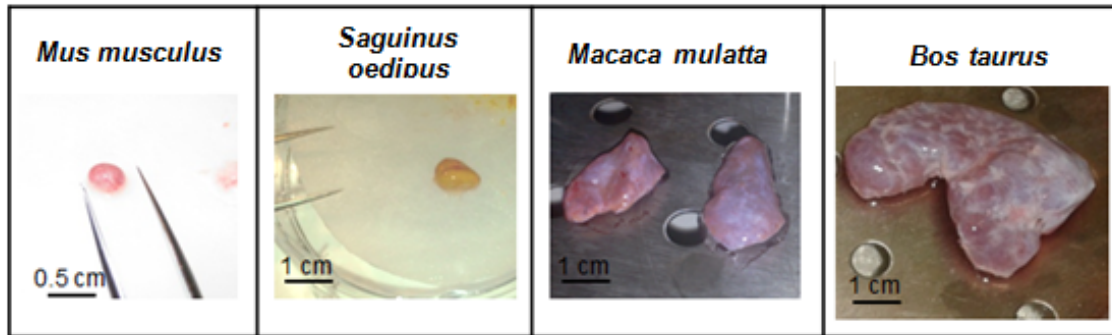
## 1.1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA Y MORFOLOGÍA DE LA GLÁNDULA ADRENAL

Las glándulas adrenales humanas son unos órganos aplanados y de apariencia triangular, situados en la parte superior de cada riñón. Funcionalmente las glándulas están compuestas una zona estructural y otra secretora. La primera, que se conoce como **cápsula**, está constituida por una gruesa capa de tejido conectivo vascularizado que recubre el tejido secretor y que se extiende hacia el interior de éste, formando conductos por los que pasan los vasos sanguíneos y los nervios. La segunda de estas zonas, la secretora, está compuestas a su vez de dos partes: la **corteza** y la **médula**, que a pesar de tener un origen diferente y funciones diversas, forman un órgano homogéneo (*Ilustración 1*).



**Ilustración 1. Las glándulas adrenales humanas.** A) Dibujo mostrando las glándulas adrenales y su localización en el cuerpo humano. B) Fotografía de dos glándulas adrenales humanas y corte sagital de una de ellas. La médula, de color blanquecino, se aprecia en la parte central de la glándula (flechas).

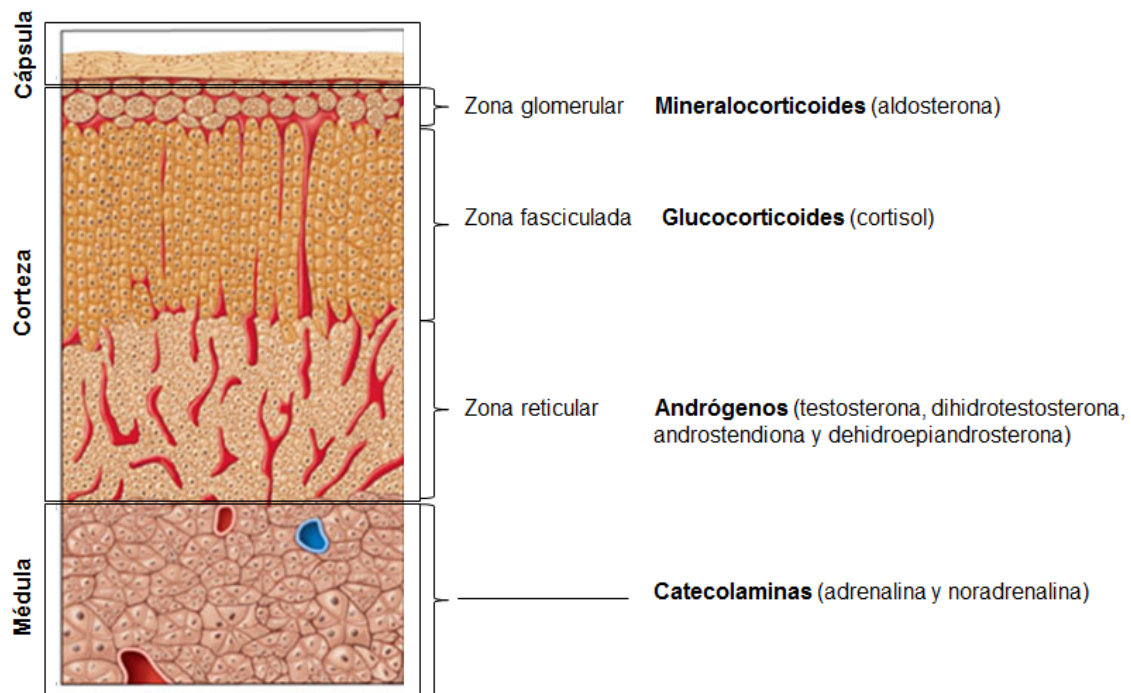
La morfología de las glándulas adrenales varía entre las distintas especies de mamíferos, no sólo en su tamaño, sino también en su morfología. En la *Ilustración 2* se muestran fotografías de glándulas obtenidas por nuestro grupo de investigación para la realización de cultivos primarios.



**Ilustración 2. Glándulas adrenales de distintas especies.** Fotografías de glándulas adrenales de *Mus musculus* (ratón), *Saguinus oedipus* (mono tití), *Macaca mulatta* (mono macaco) y *Bos taurus* (vaca). No sólo difieren en su tamaño y morfología externa, sino también en la disposición de la médula en su interior. Las glándulas de ratón, mono macaco y vaca tienen bien diferenciada la médula de la corteza, mientras que en las de mono tití el tejido es muy homogéneo y no hay una clara separación entre ambas partes.

### 1.1.1. La corteza

Se origina a partir del epitelio mesodérmico y representa entre el 70-90% del peso total de la glándula. Es la porción secretora de esteroides y está subdividida en tres capas concéntricas: la zona **glomerular** externa y estrecha; la zona **fasciculada**, la más extensa, cuyas células se organizan en cordones o columnas; y la zona **reticular**, que se dispone en cordones de células formando un tejido laxo en forma de malla que limita con la médula (*Ilustración 3*). Su función consiste en la síntesis y secreción de hormonas de naturaleza esteroidea: mineralcorticoides (responsables del volumen circulante y la presión arterial), glucocorticoides (relacionados con el metabolismo energético y la inmunosupresión) y hormonas sexuales (relacionadas con la aparición de algunos caracteres sexuales secundarios).



**Ilustración 3. Disposición de las diferentes capas de la glándula adrenal.** Puede verse la distribución en tres capas bien definidas de la corteza y las principales hormonas sintetizadas.

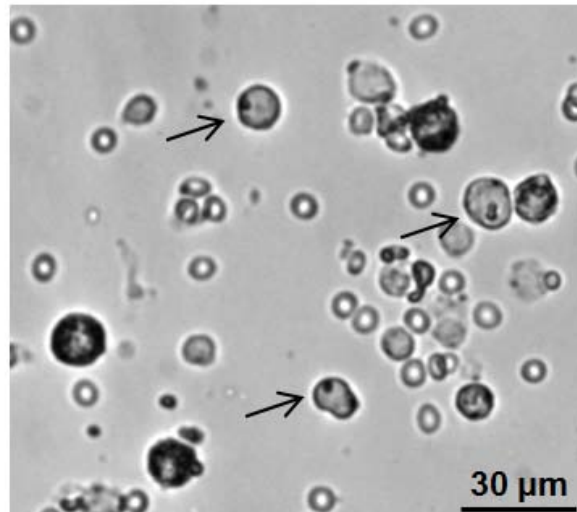
### 1.1.2. La médula

Constituye una estructura neuroendocrina que funcionalmente se integra dentro del sistema nervioso autónomo y que puede considerarse como un ganglio simpático modificado. Comparte un origen embriológico con el sistema simpático, ya que al igual que éste proviene del neuroectodermo (Weston, 1970; Aloe y Levi-Montalcini, 1979; Tischler, 2002). Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal (Le Douarin y col., 2008) dando lugar a la médula de la glándula adrenal. Como consecuencia de la actividad de diversos factores de crecimiento, las células se diferencian y se induce la síntesis de catecolaminas (Bilodeau y col., 2000; Bilodeau y col., 2005). Por su origen y por su ubicación, la médula adrenal es considerada un ganglio simpático modificado y las células cromafines que la componen son neuronas modificadas que liberan sus productos de secreción directamente al torrente sanguíneo. Está constituida principalmente por un tejido de células poliédricas que se distribuyen en cordones rodeados por redes capilares que las nutren y, a la vez, recogen sus productos de secreción (Cocchia y Michetti, 1981). Sus células se denominan **cromafines**

porque la reacción de oxidación que sufren las catecolaminas en presencia de sales de cromo les confiere una coloración parda al microscopio óptico (Coupland, 1965; Coupland y Hopwood, 1966). Estas células son responsables de la síntesis, almacenamiento y secreción de las catecolaminas (dopamina, adrenalina y noradrenalina) que ejercen una gran variedad de efectos en el organismo:

- 1) Actúan sobre el metabolismo de los glúcidos (estimulan la glucogenolisis, aumentando los niveles de glucosa en sangre).
- 2) Actúan sobre el metabolismo de los lípidos (favoreciendo la movilización de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo).
- 3) Redistribuyen el volumen sanguíneo circulante (dilatan los vasos que irrigan los músculos esquelético y cardíaco mientras que contraen los que irrigan la piel o el intestino).
- 4) Aumentan la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la frecuencia y profundidad de la respiración.
- 5) En el sistema nervioso central incrementan la atención y la vigilia.
- 6) A nivel de otros sistemas producen vasodilatación pupilar, broncodilatación y paralización de la actividad digestiva.

La morfología de las células cromafines es bastante homogénea en numerosas especies. Tienen apariencia poligonal en la glándula intacta, pero adoptan morfología esférica (de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diámetro) cuando se aíslan en cultivo (Kajiwara y col., 1997; Barbara y col., 1998) (*Ilustración 4*). Presentan grandes y abundantes vesículas de secreción en su citoplasma, denominadas vesículas de núcleo denso, por su alto contenido peptídico y opaco a los electrones. En función de la catecolamina que secretan se han descrito principalmente dos tipos de células cromafines: **adrenérgicas** y **noradrenérgicas**. A diferencia con las células noradrenérgicas, las adrenérgicas cuentan con la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) en su citoplasma, lo que les permite transformar la noradrenalina en adrenalina.



**Ilustración 4. Fotografía de un cultivo de células cromafines humanas.** En el cultivo primario se pueden observar células cromafines (esféricas, señaladas por flechas).

Además de las células adrenérgicas y noradrenérgicas también existe un tercer tipo de célula cromafín: las células cromafines llamadas SIF (small intensely fluorescent) que contienen vesículas pequeñas (Michel-Béchet y col., 1963; Gorgas y Bock, 1976; Kanno, 1998; Aunis y Langley, 1999). Poseen un fenotipo de desarrollo intermedio entre células cromafines noradrenérgicas y neuronas, y se cree que podrían ejercer el papel de interneuronas (Coupland, 1989).

A pesar de que las células cromafines constituyen el tipo celular más importante desde el punto de vista estructural y funcional, en la médula existen también otros tipos de células, como las sustentaculares, las endoteliales y los fibroblastos, además de las terminaciones nerviosas esplácnicas (Cocchia y Michetti, 1981; Coupland, 1965).

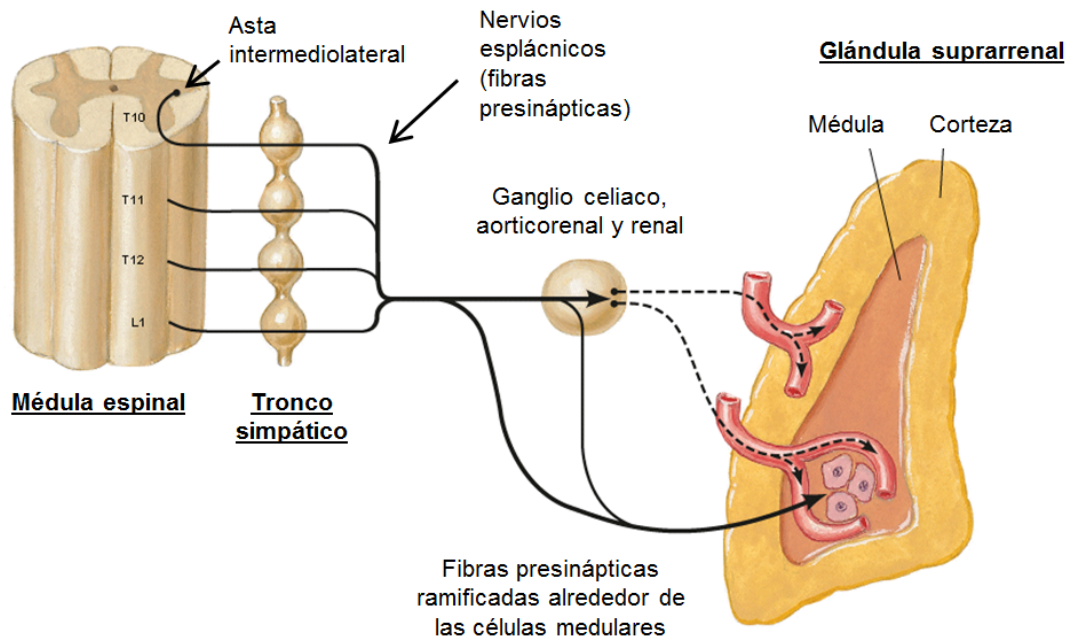
## 1.2. INERVACIÓN DE LA GLÁNDULA ADRENAL

La **corteza** adrenal, a diferencia de la médula, carece de inervación por lo que la síntesis de esteroides y la actividad celular se controlan a distancia por la hormona adrenocorticotropa liberada por la hipófisis.

La **médula** adrenal recibe inervación por parte de fibras preganglionares simpáticas del nervio esplácnico procedentes de la médula espinal, cuyos cuerpos celulares se localizan en las columnas celulares intermediolaterales (Hirano,



1982). La mayor parte de estas fibras proceden del nervio esplácnico mayor, pero también contribuyen a su inervación los nervios esplácnicos menores y otras fibras procedentes de los ganglios celíacos lumbares (Holets y Elde, 1982; Appel y Elde, 1988). Los axones pasan a través de los ganglios de la cadena simpática prevertebral a ese nivel y llegan a la cápsula suprarrenal donde forman un rico plexo. Desde aquí las fibras penetran en la glándula, atraviesan la corteza y llevan sus terminales axónicas a contactar con una o varias células cromafines de la médula adrenal. La población medular de células cromafines se organiza en clusters o acinos de unas cien células (Hillarp, 1946). Cada una puede estar en contacto con varios botones sinápticos de 2-3  $\mu\text{m}$  cada uno (Iijima y col., 1992; Kajiwara y col., 1997; Coupland, 1965), que pueden proceder incluso de la misma fibra (Kajiwara y col., 1997). Su naturaleza química es principalmente colinérgica, si bien en algunos casos se ha descrito la presencia de encefalina como transmisor (Pelto-Huikko y col., 1985; Holgert y col., 1995), secreción de sustancia P (Linnoila y col., 1980; Zhou y Livett, 1990), VIP y PACAP (Malhotra y Wakade, 1987; Wakade, 1988; Wakade, 1998). Se considera que esta sinapsis es un ganglio modificado puesto que la neurona que se consideraría posganglionar, la célula cromafín, no inerva ningún órgano directamente a través de axones sino que ejerce un control simpático difuso al verter sus neurotransmisores a la sangre (*Ilustración 5*).



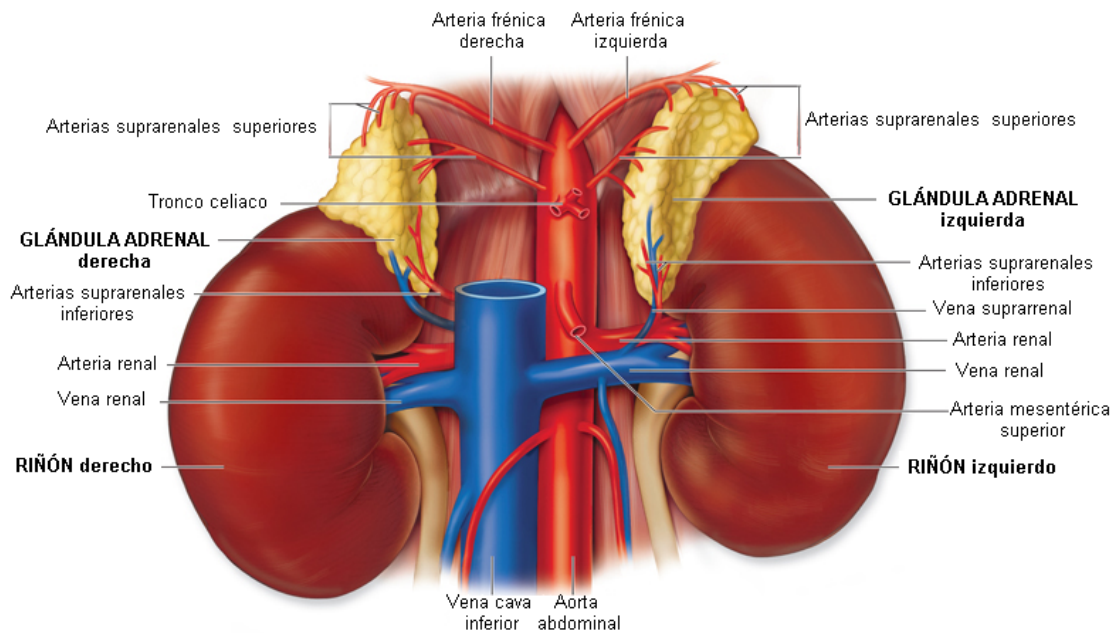
**Ilustración 5. Inervación simpática de la médula adrenal.** El soma de las neuronas simpáticas presinápticas reside en el asta intermediolateral de la región torácica inferior y lumbar superior de la médula espinal. Estas neuronas proyectan sus axones que pasan a través de los ganglios de la cadena simpática paravertebral sin hacer sinapsis y salen formando parte del nervio esplácnico hasta llegar a la médula.

### 1.3. IRRIGACIÓN DE LA GLÁNDULA ADRENAL

Cada glándula adrenal está irrigada por varias arterias y drena a una vena. La irrigación arterial procede de ramas de la aorta, la arteria renal y la arteria frénica inferior. La arteria renal se ramifica en las arterias suprarrenales superiores, medias e inferiores y, a su vez, estos vasos se ramifican en muchas arterias pequeñas antes de atravesar las cápsula, originando un plexo y dando origen a tres patrones principales de distribución sanguínea (*Ilustración 6*). Los vasos forman un sistema compuesto por:

- *Capilares capsulares* que irrigan la cápsula.
- *Capilares sinusoidales* corticales fenestrados que irrigan la corteza y desembocan después en sinusoides capilares medulares.
- *Arteriolas medulares* que atraviesan la corteza para irrigar los sinusoides capilares medulares.

Por el contrario, son drenadas por una sola vena, la adrenolumbar o medular central. La vena adrenolumbar derecha desemboca en la cava inferior mientras que la izquierda lo hace en la vena renal. El drenaje venoso de la corteza circula a través de la médula en un sistema porta que permite a los glucocorticoides sintetizados en la corteza llegar directamente a la médula y ejercer en ella ciertas acciones; por ejemplo, el cortisol regula la síntesis de algunos péptidos y de la adrenalina, controlando la actividad de la enzima PNMT.



**Ilustración 6. Esquema representativo de la vascularización de las glándulas adrenales en el cuerpo humano.**

#### 1.4. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LA GLÁNDULA ADRENAL

La **corteza adrenal**, como ya he comentado anteriormente, está bajo el control del eje hipotálamo-hipofisario y se encarga de la síntesis y liberación de hormonas esteroideas: mineralocorticoides, glucocorticoides y hormonas sexuales. Entre sus funciones se encuentran las de regular el equilibrio hídrico y la tensión arterial, controlar el metabolismo energético, modular la respuesta inflamatoria e inmunitaria, y participar en la síntesis del andrógeno testosterona.

La **médula adrenal**, junto al sistema nervioso simpático, determinan buena parte de las respuestas adaptativas al estrés. Como ya comenté al principio, uno de los principales papeles de las catecolaminas está en la respuesta de “lucha o

huída” que se genera ante una situación de estrés o amenaza en el que el principal objetivo del organismo es hacer frente al estímulo estresante, reajustando sus actividades biológicas. Las células cromafines liberan sus vesículas secretoras al torrente sanguíneo en respuesta a dos tipos de estímulos: a un incremento de la actividad de los nervios espláncnicos, que liberarán el neurotransmisor fisiológico acetilcolina (ACh), o a estímulos químicos que llegan a la médula por vía hemática. Entre los primeros figuran las situaciones de estrés físico (hipoxia, hipoglucemia o hipotermia) o emocional (miedo, ansiedad, alerta). Por vía hemática pueden llegar sustancias como la histamina, la bradicinina o la angiotensina II, liberadas en situaciones como la alergia o la hipotensión. Las catecolaminas liberadas por los distintos estímulos pueden actuar en diferentes puntos diana, principalmente en el sistema cardiovascular, el sistema endocrino y el sistema nervioso central. En el sistema cardiovascular, la adrenalina incrementa la frecuencia cardíaca, el volumen minuto y la presión arterial sistólica, a la vez que produce un aumento de consumo de oxígeno por el miocardio. Produce vasodilatación de las arteriolas musculares y coronarias pero también la constricción de los vasos que irrigan la piel, las mucosas y el área esplácnica. En el sistema respiratorio, ejerce una intensa broncodilatación a la que se suma la acción descongestionante debida a la vasoconstricción que produce en la mucosa de las vías respiratorias y en la circulación pulmonar. En el iris contrae el músculo radial y produce midriasis. También inhibe la micción relajando el músculo detrusor y contrayendo el esfínter, y en el tracto gastrointestinal predomina la acción relajante sobre la contracción. En el útero humano grávido y a término reduce la frecuencia de las contracciones. Los efectos metabólicos tienen como resultado global la elevación de la glucemia para aumentar la disponibilidad de energía en el organismo, y un aumento del metabolismo en el músculo estriado con producción de ácido láctico. En el hígado se inhibe la glucógeno sintetasa impidiendo la incorporación de moléculas de glucosa a las cadenas de glucógeno, y además se activa la glucógeno fosforilasa, que activa la glucogenolisis. A esto se suma un aumento en la gluconeogénesis, la acción inhibidora de la secreción de insulina y un incremento en la lipólisis. En el músculo estriado acorta el estado activo del músculo rojo y facilita la descarga de los husos musculares, lo que desencadena el temblor muscular asociado a la administración de adrenalina.

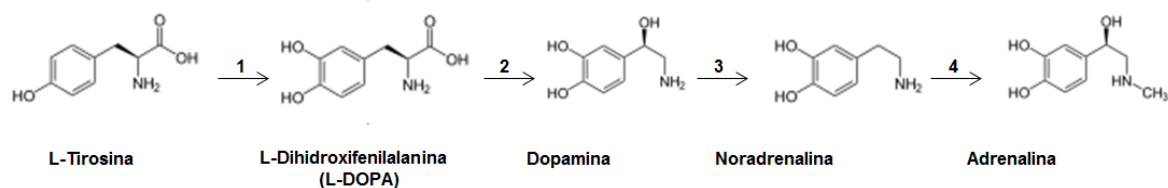
Todos estos procesos preparan al organismo para afrontar rápidamente una situación de “lucha o huida” frente al estímulo estresante. La liberación basal de catecolaminas es muy baja, del orden de nanogramos por minuto; sin embargo, frente a situaciones de estrés, se produce un vertido masivo de adrenalina (70%) y noradrenalina (30%) al torrente sanguíneo, incrementándose su concentración plasmática hasta 60 veces (Cryer, 1980; Wakade, 1981; Takiyyuddin y col., 1994). Por tanto, en la cadena de reacciones mediante las cuales el cerebro coordina la respuesta al estrés, el sistema nervioso simpático y la médula adrenal tienen un papel predominante.

Además, junto con las catecolaminas se coliberan otras sustancias igualmente almacenadas en las vesículas cromafines: ATP, péptidos opiáceos (dinorfinas y encefalinas), otros péptidos (péptido intestinal vasoactivo, neuropéptido Y (NPY), sustancia P, etc.), ascorbatos o cromograninas y sus derivados. Su presencia y funciones en la célula cromafín no están del todo aclaradas, pero se ha demostrado que muchas de ellas son capaces de regular la secreción adrenal de manera autocrina o paracrina, e incluso se postula que algunas ejerzan un papel hormonal (Gandía y col., 1993; Albillos y col., 1996a; Albillos y col., 1996b; Winkler y Fischer-Colbrie, 1998). En humano la secreción de catecolaminas está regulada por el NPY, presumiblemente actuando por la vía de los receptores NPY del tipo  $\gamma_3$  (Cavadas y col., 2001). También se ha visto que factores como la angiotensina II (Cavadas y col., 2003) o la interleuquina-1 $\beta$  (Rosmaninho-Salgado y col., 2009) regulan la liberación de catecolaminas y NPY.

Las catecolaminas también llevan a cabo importantes funciones reguladoras en sinapsis dopaminérgicas, noradrenérgicas y adrenérgicas. De hecho, varios estados patológicos se han asociado a alteraciones en la síntesis, almacenamiento, liberación o almacenamiento de estas catecolaminas, como son la hipertensión, la isquemia coronaria, enfermedades cerebrovasculares, depresión endógena, esquizofrenia, Parkinson, arritmias cardíacas o asma.

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre las enzimas que controlan la síntesis de catecolaminas. La enzima tirosina hidroxilasa (**TH**) cataliza la conversión de tirosina a L-dihidrofenilalanina (L-Dopa), un sustrato para la

descarboxilasa que convierte la L-Dopa en dopamina. Este paso inicial de la vía de síntesis es limitante y controla la tasa de síntesis de las catecolaminas (*Ilustración 7*). Mediante procesamiento alternativo (splicing) de un transcrito primario pueden crearse varias isoformas de la TH. Polimorfismos en este gen se han ligado a hipertensión (Sharma y col., 1998), dependencia de la nicotina (Anney y col., 2004), y un número de factores cardiovasculares incluyendo el ritmo cardiaco basal y postestrés (Zhang y col., 2004), y a una mayor respuesta hemodinámica en humanos (Barbeau y col., 2003).



**Ilustración 7. Ruta de síntesis de catecolaminas.** La tirosina es convertida en L-DOPA por la enzima tirosina hidroxilasa (1), la L-DOPA en dopamina por una descarboxilasa (2), la dopamina en noradrenalina por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (3) y finalmente ésta pasa a adrenalina gracias a la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (4).

La dopamina es convertida en noradrenalina por la Dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (DBH). Se ha descrito un gran número de polimorfismos en el gen humano que codifica para esta enzima (Cubells y Zabetian, 2004) y estos se han relacionada con varios desórdenes psiquiátricos tales como la esquizofrenia, la depresión psicótica, el alcoholismo, el déficit de atención y la hiperactividad, con la susceptibilidad al autismo y a la enfermedad de Parkinson (Anney y col., 2004; Cubells y Zabetian, 2004).

Finalmente, la noradrenalina es convertida a adrenalina por la enzima PNMT. También hay un amplio número de polimorfismos del gen que codifica esta proteína que están asociados con desórdenes como la hipertensión, con la enfermedad de Alzheimer temprana esporádica y con la esclerosis múltiple (Cui y col. 2003; Mann y col., 2002).

## 2. VENTAJAS DE LA CÉLULA CROMAFÍN COMO MODELO NEUROSECRETOR: EL TÉRMINO PARANEURONA

A mediados de los años 70, Tsuneo Fujita (Fujita, 1976) y Shigeru Kobayashi (Kobayashi, 1977) introdujeron el término **paraneurona** para describir a las células neuroendocrinas con propiedades similares a las neuronas en cuanto a su origen, estructura, función y metabolismo y pueden considerarse como paraneuronas ya que cumplen los siguientes requisitos:

- Sintetizan neurotransmisores o productos relacionados con éstos (adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina y serotonina).
- Poseen vesículas sinápticas y/o vesículas de secreción (donde se almacenan los neurotransmisores sintetizados).
- Secretan de manera regulada neurotransmisores que actúan sobre receptores situados en la membrana celular.

En base a estos criterios, las células cromafines de los mamíferos podrían considerarse paraneuronas, ya que presentan un gran parentesco con las neuronas simpáticas postganglionares:

- ambos tipos de células derivan de la cresta neural,
- poseen vesículas sinápticas y/o de secreción,
- tienen función neurosecretora (las células cromafines liberan catecolaminas, ATP, NPY y opioides en respuesta a la estimulación por acetilcolina (ACh) liberada por nervios originados en la médula espinal),
- poseen receptores nicotínicos (Holman y col., 1994; Wilson y Kirshner, 1977; Holman y col., 1995; Barbara y Takeda, 1996) y muscarínicos

(Douglas y Poisner, 1965) sobre los que actúa la ACh liberada por la terminal presináptica,

- disparan PAs (Biales y col., 1976; Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980),
- poseen canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sensibles a voltaje (Fenwick y col., 1982b; Artalejo y col., 1993).
- exhiben facilitación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por prepulsos despolarizantes repetidos (Hoshi y col., 1984; Hoshi y Smith, 1987; Ikeda y col., 1991; Artalejo y col., 1992; Albillos y col., 1996a),
- emiten prolongaciones al co-cultivarlas con astroglia o al exponerlas al factor de crecimiento nervioso (Levi-Montalcini y Aloe, 1980; Tischler y col., 1980; Unsicker y col., 1980; Unsicker y col., 1978),
- poseen NGF, TGF y GDNF (Krieglstein y col., 1996; Unsicker y Krieglstein, 1996),
- tienen receptores para muchos otros neurotransmisores como el GABA (Bormann y Clapham, 1985), el ATP, opioides, el NPY (Cavadas y col., 2001) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina o CGRP (Di Angelantonio y col., 2002).

Existen diversos modelos en los cuales se ha estudiado la transmisión sináptica y en particular el fenómeno de exocitosis. Entre los modelos celulares más utilizados se encuentran las neuronas, los mastocitos, las células PC12, las células beta pancreáticas y las células cromafines. Dichos modelos se utilizan para realizar diferentes estudios dependiendo de la técnica y del tema de interés. Las neuronas contienen vesículas sinápticas pero éstas son muy pequeñas por lo que es difícil trabajar con ellas. De los cuatro tipos celulares mencionados los mastocitos contienen los gránulos secretores más grandes (1000 nm) (Popov., 1988) pero no son células excitables por  $\text{Ca}^{2+}$  ya que en ellos éste es un cofactor



(Lindau y Fernández., 1986). Las células PC12 son una línea celular derivada de células cromafines y pueden ser un buen modelo de estudio, pero tienen la desventaja de que al ser una línea celular, no reflejan todas las características fisiológicas de una célula in vivo. Finalmente, las cromafines como ya se ha comentado antes, son células secretoras y excitables (Monck y col., 1994) que tienen una exocitosis rápida en la que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un factor crucial (Albillos A, 1997).

Debido a su origen embriológico, los mecanismos secretores de las células cromafines poseen muchas similitudes con los de las neuronas, tanto en aspectos biofísicos como moleculares. Ambas células son excitables y la liberación de neurotransmisores o adrenalina se produce a través del disparo de PAs que activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) ubicados en la membrana, generando un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la posterior liberación del contenido vesicular (Augustine y Neher, 1992). En cuanto a la maquinaria de exocitosis, en las células cromafines se ha descrito la presencia de la gran mayoría de las proteínas involucradas en la secreción que han sido identificadas en zonas activas de las terminales sinápticas (Roth y Burgoyne, 1994 ; Gerber y Sudhof, 2002; Burgoyne y Morgan, 2003).

Una diferencia muy importante entre las células cromafines y las neuronas es el grado de acoplamiento entre el estímulo y la secreción. Mientras que en las neuronas los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y las vesículas están altamente acoplados en zonas activas, permitiendo una rápida y eficiente liberación de los neurotransmisores, la secreción de hormonas desde las células cromafines se vierte directamente al torrente sanguíneo, lo cual actúa como paso limitante en el proceso de señalización. De hecho, mayoritariamente, la secreción desde las células cromafines ocurre mucho más lentamente que en las terminales nerviosas (Chow y col., 1992, Chow y col., 1994; Seward y col., 1995). De cualquier modo, frente a una situación de estrés, estas células liberan las catecolaminas en milisegundos, por lo que el acoplamiento estímulo-secreción en estas células puede considerarse una situación intermedia entre neuronas y otras células endocrinas.

En general, las células cromafines poseen características que las hacen muy propicias como modelo de experimentación de procesos como la exocitosis, el acoplamiento estímulo-secreción, la formación del poro de fusión vesicular, etc. Además, el hecho de presentar los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de diferentes subtipos las convierten en un valioso modelo para entender la estructura y función de dichos canales neuronales y su implicación en el mecanismo excitotóxico. Son células que se pueden aislar y mantener en cultivo primario con facilidad (Livett, 1984; Moro y col., 1990; Pérez-Alvarez y Albillos., 2007). Además, su tamaño es notablemente mayor que la mayoría de las terminales nerviosas y adoptan una geometría esférica en cultivo. Estas características permiten la fácil medida de corrientes iónicas y/o de capacidad de membrana ( $C_m$ ) mediante la aplicación de la técnica de "patch clamp" (ver "materiales y métodos").

Por todos los motivos citados arriba, entre otros, se justifica el empleo de las células cromafines como excelente modelo neuronal.

## **2.1. APLICACIONES CLÍNICAS**

Además de ser útiles como modelos neuronales en el laboratorio, las células cromafines también suponen una alternativa como terapia celular para diversas alteraciones neuronales (Jozan y col., 2007). Nuestro grupo publicó en 2010 una revisión del potencial de las células cromafines humanas en terapéutica (Pérez-Alvarez y col., 2010).

Por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson hay una pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. La terapia de trasplante celular es una alternativa terapéutica en esta enfermedad (Drucker-Colin y Verdugo-Diaz, 2004) debido a que hay pérdida de neuronas capaces de producir dopamina, a que la terapia sustitutiva con el precursor de dopamina L-Dopa produce una mejora significativa de los signos y síntomas, a que existe un área definida para el trasplante, y a que los implantes de células dopaminérgicas mejoran los signos de la enfermedad en modelos animales (Freed y col., 1981). El primer trasplante autólogo en humanos usando células cromafines lo llevaron a cabo Backlund y sus colaboradores en el año 1985. Hicieron un implante intraparenquimatoso de

células cromafines de la glándula adrenal en el putamen (cuerpo estriado) de dos enfermos de Parkinson, basándose en que las células cromafines producen dopamina como precursor de noradrenalina (revisado en Trifaro, 2002). Aunque la mejoría de estos pacientes fue pasajera (Backlund y col., 1985; Lindvall y col., 1987), posteriormente se produjo una intervención similar en México (Madrazo y col., 1987) que obtuvo resultados prometedores hasta un año después (Drucker-Colin y col., 1988). Ese mismo año, un equipo de investigadores chinos (Ding y col., 1988; Jiao y col., 1988) realizaba también con éxito el implante de médula adrenal autóloga en pacientes con enfermedad de Parkinson, los cuales mostraron una evolución favorable tras la intervención. En España, el primer trasplante de células cromafines se realizó en 1987 (López-Lozano y col., 1989). Estos autores hicieron hincapié en la importancia de disecar el tejido medular del de la corteza para favorecer el desarrollo de un fenotipo neuronal (Unsicker y col., 1978) ya que los corticoides liberados por estas células inhiben este proceso que, por otra parte, es facilitado en presencia de factores tróficos como el NGF, FGF y GDNF (Olson y col., 1991; Murata y col., 2008a; Murata y col., 2008b; López-Lozano y col., 1996; López-Lozano y col., 1997a; López-Lozano y col., 1997b; López-Lozano y col., 1999). De hecho, la implantación simultánea junto a otros tejidos que liberan estos factores tróficos parece influir positivamente en la supervivencia de las células cromafines implantadas (Olson y col., 1991; Date y col., 1990; Date, 1996; López-Lozano y col., 1999).

Las principales ventajas de la utilización de células cromafines adultas frente a otros tejidos son: la posibilidad de realizar trasplantes autólogos, lo que evita la inmunosupresión y las cuestiones éticas (como el uso de tejido fetal); y el alto número de células que se pueden aislar, frente a otros tejidos como el cuerpo carotídeo (Arjona y col., 2003) o el órgano de Zückerkandl (Espejo y col., 1998; Espejo y col., 2001; Fernández-Espejo y col., 2005). Sin embargo uno de los principales inconvenientes lo podría representar la escasa supervivencia de las células cromafines en la zona implantada. Esta podría verse comprometida en los enfermos de Parkinson, puesto que estos tejidos de linaje simpatoadrenal podrían sufrir cierto grado de degeneración. El grupo de Fernández-Espejo vió como inconveniente adicional que sólo un 1% de la población de células cromafines libera dopamina (Trifaro, 2002). Dado que la ruta biosintética para la obtención de

las catecolaminas principales (adrenalina y noradrenalina) implica la síntesis inicial de dopamina que es convertida en noradrenalina y adrenalina debido a la acción de las enzimas DBH y PNMT, estas dos enzimas podrían representar una diana terapéutica a considerar para interrumpir la biosíntesis catecolaminérgica e incrementar la liberación de dopamina en estos implantes autólogos. Sin embargo, otros autores apuntan que la mejoría funcional observada en los pacientes tratados no se puede deber sólo a la liberación de dopamina, ya que sólo un pequeño porcentaje de células podría liberarla, sino a los factores tróficos liberados (NGF, FGF, TGF, GDNF) por el tejido implantado (Fernandez-Espejo y col., 2005; Drucker-Colin y Verdugo-Diaz, 2004).

En el tratamiento del dolor crónico debilitante también se han empleado las células cromafines, al liberar catecolaminas y opioides que parecen ser eficaces en su tratamiento (Hama y Sagen, 1994; Sortwell y col., 1995; Tkaczuk y col., 1997; Lazorthes y col. 2000).

Dado que la cantidad de tejido es el limitante para estas estrategias mencionadas, se han llevado a cabo numerosos intentos para crear una línea de células cromafines inmortalizadas (Eaton y col., 2000). Sin embargo, la utilización de estas células no ha sido del todo apropiada, ya que la posibilidad de inducir tumores en el sistema nervioso central representa el principal inconveniente (Eaton y Duplan, 2004).

Por otro lado, el aislamiento de progenitores cromafines derivados de la cresta neural, obtenidos a partir de la médula adrenal de vaca representa una oportunidad para desarrollar neuronas potencialmente adaptables para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Chung y col., 2009).

### 3. EL PROCESO SECRETOR DE CATECOLAMINAS

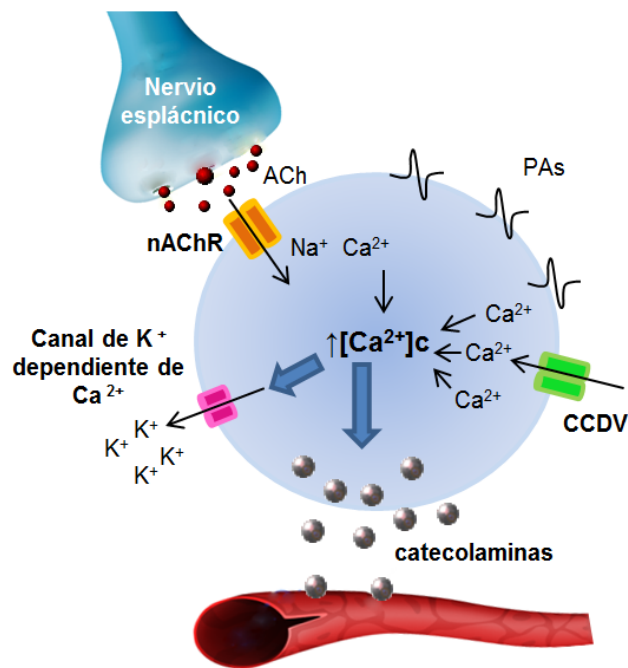
#### 3.1. ACOPLAMIENTO ESTÍMULO-SECRECIÓN: PAPEL DEL CALCIO

La secreción de catecolaminas por la célula cromafín se conoce desde las primeras décadas del siglo XX. Ya en 1934, Feldberg y Minz (Feldberg y col., 1934) demostraron que la estimulación del nervio esplácnico producía liberación de ACh y que ésta era responsable de la secreción de adrenalina por la médula adrenal. Años después, William Douglas y Donald Rubin utilizaron el concepto de “**acoplamiento excitación-secreción**”. Sus estudios sobre la secreción de catecolaminas realizados en médula adrenal de gato establecieron el mecanismo por el cual la ACh provocaba la secreción de catecolaminas en la célula cromafín, cómo influía la composición iónica del medio en la respuesta secretora y concluyeron que el mecanismo de liberación de neurotransmisores es un proceso dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  (Douglas y Rubin, 1961).

En todas las células en reposo existe una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular, denominado potencial de membrana ( $V_m$ ), que depende de las concentraciones intracelulares y extracelulares de los diferentes iones y de las conductividades relativas de la membrana a ellos. En las células no excitables este potencial tiene generalmente valores de entre -10 y -30 mV, mientras que en las células excitables es más hiperpolarizado, al menos -50 mV (Fenwick y col., 1982a; Wallace y col., 2002), siendo en las neuronas de unos -70 mV.

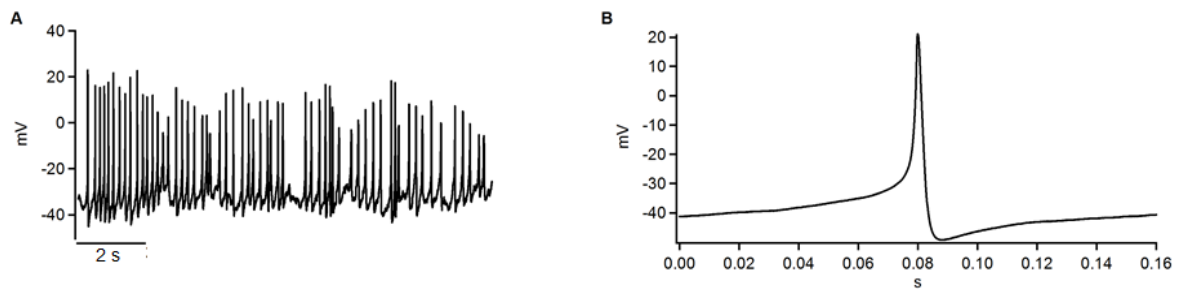
En condiciones normales, en las cuales el organismo no está sometido a estrés, las fibras esplácnicas disparan a frecuencias bajas, manteniendo la frecuencia de PAs en las células cromafines en aproximadamente ~0,1-0,5 Hz (Brandt y col., 1976). En estas condiciones las células cromafines liberan pequeñas cantidades de catecolaminas al sistema circulatorio, que permiten que los parámetros fisiológicos se mantengan en sus niveles de reposo. Cuando las células cromafines son excitadas, tanto fisiológicamente por la ACh liberada como por otros estímulos, se disparan PAs en la membrana plasmática. Se produce un

aumento en la frecuencia de disparo hasta un valor 30 veces mayor al de reposo (~15 Hz) (Iijima y col., 1992), lo cual genera una liberación masiva de adrenalina (en mayor medida) y noradrenalina (en menor medida) a la circulación general. Estas últimas llegan a los órganos diana y su efecto se suma al de la noradrenalina liberada desde los terminales simpáticos, contribuyendo a la activación de los receptores adrenérgicos. A pesar de que la secuencia real de eventos que van desde el estímulo a la liberación de catecolaminas se desconoce, diversos estudios establecen como probable la siguiente **secuencia de eventos**: tras la unión de la ACh al receptor nicotínico se produce la apertura de su canal iónico, penetrando a su través principalmente iones de  $\text{Na}^+$  y, en menor medida, de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brandt y col., 1976; Kidokoro y col., 1982). La entrada de  $\text{Na}^+$  va a provocar una ligera despolarización de la membrana, suficiente para incrementar su permeabilidad a este catión (apertura de canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje) (Douglas y Rubin, 1961a; Brandt y col., 1976; Ceña y col., 1983). Esto conduce a la entrada masiva de  $\text{Na}^+$  al interior celular, lo que va a favorecer una mayor despolarización de la membrana plasmática y el disparo de PAs (Biales y col., 1976). Como consecuencia de esta despolarización se produce la apertura de canales iónicos que permean  $\text{Ca}^{2+}$  desde el espacio extracelular, y éste catión produce finalmente la liberación de las vesículas de exocitosis (García y col., 1984) (*Ilustración 8*). Un trabajo de nuestro grupo reveló que en las células cromafines humanas, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor nicotínico a potenciales de membrana hiperpolarizados contribuía tanto a la exocitosis evocada por pulsos de ACh de 200 ms como la entrada de este mismo catión por los CCDV a potenciales de membrana despolarizados (Pérez-Alvarez y Albillos., 2007).



**Ilustración 8. Esquema representativo del proceso de acoplamiento excitación-secreción en la célula cromafín.** La unión de la ACh al receptor nicotínico provoca la entrada de iones de Na<sup>+</sup> y, en menor medida, de Ca<sup>2+</sup>. El Na<sup>+</sup> produce una ligera despolarización de la membrana, suficiente para la apertura de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje. Esto lleva a la entrada masiva de Na<sup>+</sup> al interior celular, lo que va a favorecer una mayor despolarización de la membrana plasmática y el disparo de PAs. Como consecuencia de esta despolarización se produce la apertura de canales iónicos que permean Ca<sup>2+</sup> desde el espacio extracelular (CCDV) y, finalmente, la exocitosis de neurotransmisores de las vesículas próximas a la membrana.

La fase de despolarización (fase ascendente del PA) en algunos casos es dominada sólo por la entrada de iones de Na<sup>+</sup> (Biales y col., 1976) mientras que en otros casos (ej. tejido cardíaco) se ha visto que depende tanto de los canales de Na<sup>+</sup> como de los de Ca<sup>2+</sup> (Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie., 1980; Nassar-Gentina y col., 1988). La fase de repolarización del PA en las células cromafines depende principalmente de la inactivación de los canales de Na<sup>+</sup> (Solaro y col., 1995), pero también se ha observado que la presencia de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje (Inoue y Imanaga, 1993) y dos variantes de los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> tipo BK (Solaro y Lingle, 1992; Solaro y col., 1997) contribuyen a esta fase, regulando el patrón de disparo de estas células (González-García y col., 1993; Lara y col., 1995; Montiel y col., 1995). En la *Ilustración 9* puede verse el registro original de PAs en células cromafines humanas.



**Ilustración 9. Potencial de acción en células cromafines.** A) Ejemplo de un registro original del disparo de PAs generado de manera espontánea en una célula cromafin humana. B) Ampliación de uno de los PAs del panel A.

Una vez que el  $\text{Ca}^{2+}$  llega al citosol, independientemente de la vía que haya utilizado, puede desencadenar la exocitosis pero solamente de las vesículas que están en un estadio de maduración avanzado, preparadas para sufrir la fusión con la membrana plasmática (Heinemann y col., 1993; von Ruden y Neher, 1993; Smith y col., 1998; Sorensen, 2004)

La finalización de este ciclo se produce por varios mecanismos:

- Hidrólisis de la ACh en el espacio sináptico por parte de la enzima acetilcolinesterasa.
- Desensibilización de los receptores nicotínicos por exposición continuada a ACh.
- Inactivación de los CCDV por el propio  $\text{Ca}^{2+}$  y por el voltaje.
- Inhibición de los CCDV por productos de secreción (ATP y opioides).
- Activación de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que favorecen la repolarización de la membrana plasmática, disminuyendo la excitabilidad celular.

### 3.2. SEÑALES DE CALCIO EN LA CÉLULA CROMAFÍN

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de la célula en reposo es del orden de 50-200 nM, unas 10.000 veces menor que la concentración extracelular, lo que da lugar a que incrementos relativamente pequeños de  $\text{Ca}^{2+}$  sirvan como señal



para desencadenar gran variedad de fenómenos fisiológicos. La transmisión sináptica y la secreción neuroendocrina se basan en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula fundamentalmente a través de los CCDV de la membrana (Augustine y Neher, 1992), pero no hay que olvidar que estas células poseen otros mecanismos capaces de aumentar el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, como son la liberación desde el retículo endoplasmático (RE) a través de receptores de rianodina y/o de  $\text{IP}_3$ , y la reversión del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (Pan y Kao, 1997). Además poseen varios mecanismos de recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  como la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa y el intercambiador  $1\text{Ca}^{2+}/3\text{Na}^+$  de la membrana plasmática (Pan y Kao, 1997), una  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa en el RE y la mitocondria (Herrington y col., 1996; Pan y Kao, 1997), y otros sistemas que regulan la distribución espacio-temporal de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  de estas células (Marengo y Monck, 2003). Todo esto demuestra que la célula cromafín posee una serie de mecanismos que ayudan a regular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y a evitar la sobrecarga de este catión que podría desencadenar multitud de procesos.

### 3.3. EL PROCESO DE EXOCITOSIS

La exocitosis del contenido vesicular es la base de la comunicación intercelular, a través de la liberación de una amplia gama de moléculas que van a actuar a nivel extracelular. Es un proceso bastante complejo al que se ha dedicado una amplia investigación. A modo de resumen, podría decirse que existe una serie de proteínas específicas que ayudan a que se produzca la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática, ya que la repulsión entre ambas membranas y el entorno acuoso no favorecería su fusión espontánea (Sudhof, 1995). Algunas de estas proteínas, muy conservadas en la evolución y en los diferentes tipos de neuronas y células neuroendocrinas, constituyen el denominado **complejo SNARE** (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor), y se localizan tanto en la membrana de las vesículas secretoras (v-SNAREs) como en la membrana plasmática (t-SNAREs). Se han identificado principalmente tres tipos (Roth y Burgoyne, 1994): sinaptobrevinas o VAMPs, sintaxinas y SNAP-25. Todo este complejo entramado de proteínas constituye la denominada “maquinaria de la exocitosis”. Respecto a los requerimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  para que se produzca exocitosis, hay trabajos que indican que el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  para la fusión de membranas en células neuroendocrinas tiene una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  mayor que en células neuronales; así, en células cromafines la concentración eficaz 50 (CE50) de  $\text{Ca}^{2+}$  para la exocitosis es de 10-20  $\mu\text{M}$  (Heinemann y col., 1994) y la exocitosis se podría disparar a partir de concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico cercanas a 5  $\mu\text{M}$ , mientras que en neuronas es de aproximadamente 190  $\mu\text{M}$  (Heidelberger y col., 1994). No obstante, la relación entre  $\text{Ca}^{2+}$  y exocitosis en ambos tipos de células es muy controvertida en la literatura, y existen trabajos que postulan una relación lineal entre ellos y otros que suponen la cooperatividad entre iones  $\text{Ca}^{2+}$  durante el proceso de exocitosis (Augustine y col., 1991; Meir y col., 1999; Carabelli y col., 2003).

#### 4. CANALES IÓNICOS IMPLICADOS EN LA EXCITABILIDAD DE LA CÉLULA CROMAFÍN

Los canales iónicos representan a una variedad de proteínas presentes en las membranas biológicas, los cuales dependiendo de la especialización celular desempeñan muy diversas funciones. Son elementos decisivos en los procesos de señalización neuronal y transmisión sináptica. En las células excitables son responsables de los cambios en el potencial eléctrico transmembrana en respuesta a un estímulo. La activación de un canal iónico abre un poro selectivo en la membrana de las células excitables permitiendo la difusión de cationes o aniones de acuerdo a su gradiente electroquímico. Poseen estados funcionales dinámicos: en reposo están cerrados y activos, cuando permanecen abiertos también están en periodo activo, y en los estados refractarios permanecen cerrados e inactivos. En la mayoría de los casos la activación de un canal iónico resulta en la formación de una corriente de entrada de iones de  $\text{Na}^+$  o de  $\text{Ca}^{2+}$ , causando la disminución del potencial de reposo. Mientras que la activación de los canales de  $\text{K}^+$  permite la salida de estos iones con la consecuente repolarización o hiperpolarización celular.

El mejor conocimiento de estos canales iónicos involucrados en la excitabilidad celular se ha conseguido gracias a tres avances científicos: la técnica de medición de la conductividad con fijación de membrana o pinzamiento zonal (“**patch-clamp**”), el uso de **herramientas farmacológicas**, moléculas orgánicas sintéticas y principalmente neurotoxinas (procedentes de arañas, plantas, caracoles marinos, escorpiones, serpientes, ranas, abejas, etc.) que permiten distinguir selectivamente los diversos tipos de canales iónicos presentes en la membrana celular, y la **clonación y secuenciación** de los genes que los conforman.

De este modo, en la célula cromafín se han identificado más de 15 tipos de canales iónicos que pueden dividirse en tres grandes grupos en función del mecanismo que induce o favorece su apertura: 1) canales activados por voltaje; 2) canales activados por ligando; 3) otros canales. Dado que son los canales

activados por voltaje los protagonistas de esta Tesis, es a ellos a los que dedicaré los siguientes apartados.

#### 4.1. CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR VOLTAJE

Son canales que permiten el paso de iones dependiendo del voltaje transmembrana. Dentro de esta superfamilia se incluyen los canales de  $\text{Na}^+$ , los de  $\text{K}^+$  y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV):

- Gracias a la técnica de “patch-clamp”, en 1982 el grupo de Erwin Neher (Fenwick y col., 1982b) fue el primero en describir las propiedades eléctricas de los **canales de  $\text{Na}^+$**  presentes en la célula cromafín. En condiciones de bajas concentraciones de ACh o de baja densidad de receptores nicotínicos, estos canales se comportan como amplificadores de la señal nicotínica, promoviendo una mayor despolarización de la membrana y facilitando la apertura de los CCDV. En el resto de situaciones, la despolarización producida por la activación de los receptores nicotínicos por sí misma es capaz de reclutar los CCDV, sin que sea necesaria la intervención de los canales de  $\text{Na}^+$  (Kidokoro y col., 1979; Kirpekar y Prat, 1979; Kidokoro y Ritchie, 1980).

- Los **canales de  $\text{K}^+$**  de la célula cromafín contribuyen a la repolarización durante los PAs, regulando su patrón de disparo y la exocitosis (González-García y col., 1993; Lara y col., 1995; Montiel y col., 1995). Estos canales se abren y cierran en respuesta a variaciones en el potencial de membrana, de forma que señales de despolarización o hiperpolarización pueden aumentar su apertura generando una corriente de rectificación de salida o de entrada, respectivamente.

- Los **CCDV** son la principal vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular en la célula cromafín. Su apertura permite el flujo selectivo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares entre los que se incluyen la secreción de neurotransmisores, la contracción muscular, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, etc. De manera que constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de

la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares. Se van a desglosar en otro apartado en profundidad, ya que son los protagonistas estudiados en los experimentos presentados en esta Tesis.

## 5. LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Tal y como se ha podido ver varias veces a lo largo de la introducción de esta Tesis, los cambios en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico regulan una variedad de funciones celulares importantes como la neurotransmisión, la contracción muscular, la proliferación celular, la secreción hormonal, la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares, la expresión génica y participan también como una señal en la fecundación y en la muerte celular por necrosis o apoptosis. Por esto los CCDV son tan importantes, porque participan en la regulación de todos estos procesos. Debido al papel que juegan en multitud de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, en este trabajo se revisan aspectos relacionados con la estructura, clasificación, biología molecular y las propiedades biofísicas y farmacológicas de estos canales.

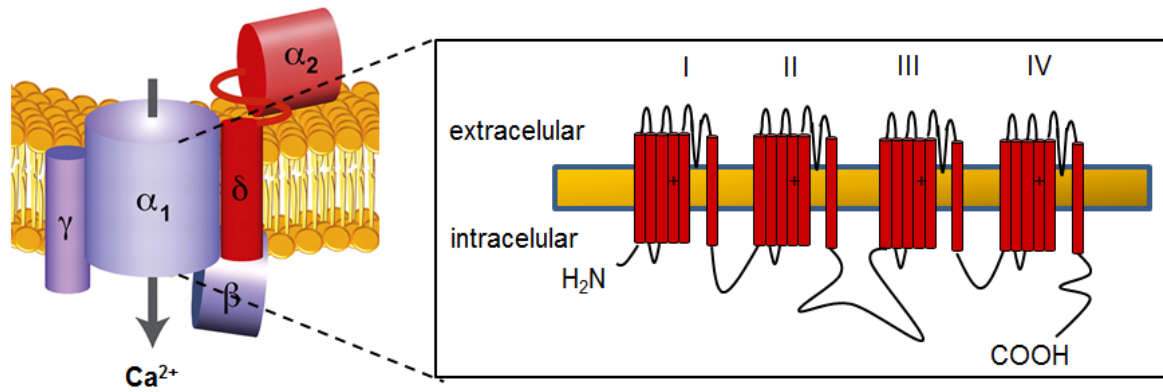
Los CCDV se encuentran presentes en la membrana plasmática de células nerviosas, musculares, cardíacas, endocrinas,  $\beta$ -pancreáticas e inmunológicas y constituyen una de las principales vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula en respuesta a una despolarización de la membrana plasmática. El avance de las técnicas electrofisiológicas (principalmente la técnica de "patch-clamp"), el desarrollo de marcadores fluorescentes para  $\text{Ca}^{2+}$ , la identificación y purificación de diferentes neurotoxinas específicas para los CCDV y las técnicas de biología molecular, han permitido la identificación y caracterización de diferentes subtipos de CCDV que coexisten en las células excitables. La clasificación de estos canales se puede realizar en base a sus propiedades biofísicas y farmacológicas, así como en base a aspectos de biología molecular.

## 5.1. ESTRUCTURA

Los CCDV son proteínas oligoméricas formadas por una subunidad principal  $\alpha 1$ , que sirve como poro y sensor del cambio de potencial y diversas subunidades reguladoras o auxiliares  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$  (*Ilustración 10*).

La subunidad  $\alpha 1$  es la más grande (190-250 kDa) y mantiene la misma estructura general que los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje (Tsien y col., 1991). Está constituida por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de ellos formado a su vez por seis segmentos transmembrana (S1-S6). El segmento S4 de cada dominio está altamente cargado y se cree que es el que actúa como sensor de los cambios de potencial de la membrana (Jarvis y col., 2002; Doering y Zamponi, 2003). El asa o lazo P que une el quinto y sexto segmento (S5 y S6) en cada dominio también forma parte del poro del canal y determina la conductancia y selectividad iónicas (McCleskey, 1994). Es la responsable de la formación del poro central, altamente selectivo para el ion  $\text{Ca}^{2+}$  y la que confiere características específicas al canal tales como la permeabilidad y las cinéticas de activación e inactivación, que presentan diferencias para cada subtipo de canal (Catterall, 2000). Además, esta subunidad es la que contiene los sitios de interacción para fármacos, toxinas y segundos mensajeros.

Las demás subunidades son denominadas reguladoras o auxiliares. Las asas citoplasmáticas que unen los cuatro dominios son estructuralmente importantes para que ocurra la interacción entre las subunidades y segundos mensajeros (Marcantoni y col., 2008).



**Ilustración 10. Representación gráfica del canal del calcio dependiente de voltaje.** Se muestran las distintas subunidades que conforman el canal ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) y el detalle de la subunidad  $\alpha_1$  con sus 4 dominios (I, II, III, IV). Cada dominio consta de seis segmentos hidrofóbicos transmembrana (S1-S6). El segmento S4 de cada dominio está altamente cargado y es el que actúa como sensor del voltaje.

La diversidad funcional de los diferentes subtipos se debe a la existencia de múltiples genes que codifican para diferentes clases de subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$ , así como variantes de un mismo gen debido a un procesamiento alternativo (Hofmann y col., 1999). Hasta la fecha se han identificado en el genoma humano diez isoformas de la subunidad  $\alpha_1$ , cada una de ellas susceptibles de sufrir un procesamiento alternativo adicional. Según sus características biofísicas y farmacológicas dan lugar a cinco canales de  $\text{Ca}^{2+}$  diferentes (ver más adelante). Las subunidades  $\beta$  y  $\alpha_2$ - $\delta$  son necesarias para la inclusión del canal en la membrana plasmática y el ajuste fino de las propiedades de compuerta de la mayoría de las subunidades  $\alpha_1$ . Existen al menos cuatro subunidades  $\beta$ , cuatro  $\alpha_2$ - $\delta$  y ocho  $\gamma$ . Las subunidades  $\alpha_1$  son necesarias para la formación del canal, por lo que la disrupción del gen para esta subunidad en particular produce una pérdida completa de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  correspondientes. Para corregir este defecto, se puede producir una regulación al alza de otros tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Aldea y col., 2002). Sin embargo, la ablación del gen que codifica para las subunidades  $\beta$  o  $\alpha_2$ - $\delta$  no lleva necesariamente a una pérdida total del canal asociado a esta subunidad porque puede existir una compensación con otras isoformas de estas subunidades accesorias.

## 5.2. CLASIFICACIÓN

En un principio, los CCDV se clasificaron atendiendo al rango de voltaje necesario para su activación. Se vio que algunos canales necesitaban de una pequeña despolarización para ser activados, mientras que otros requerían un mayor salto en el voltaje de membrana para abrirse (Hagiwara y col., 1975; Llinás y Yarom., 1981). De acuerdo a este criterio, se agruparon en dos categorías: canales de bajo umbral de activación (LVA: low voltage-activated), que se abren a potenciales superiores a -70 mV, y canales de alto umbral de activación (HVA: high voltage-activated), que requieren una fuerte despolarización de la membrana para abrirse (superior a -30 mV). Pero la aparición de nuevas herramientas farmacológicas permitió realizar una nueva clasificación de los canales. De modo que, dentro de los canales HVA se pueden distinguir los subtipos L, N, P/Q y R y los del tipo LVA son los llamados canales de tipo T.

Hace unos años esta nomenclatura se modificó para unificarla con la utilizada para otros tipos de canales iónicos (Ertel y col., 2000), empleando el símbolo químico del principal ión permeante (Ca) junto a un subíndice indicando el principal regulador fisiológico, el voltaje ( $Ca_v$ ). El identificador numérico, correspondería a la subfamilia de genes que codifican para la subunidad  $\alpha_1$  de los canales  $Ca_v$  (3 subfamilias), y el orden del descubrimiento de dicha subunidad dentro de la subfamilia (de 1 a n). De acuerdo con esta nomenclatura, la subfamilia  $Ca_v1$  ( $Ca_v1.1$ - $Ca_v1.4$ ) incluye canales que contienen las subunidades  $\alpha_{1S}$  (Tanabe y col. 1987),  $\alpha_{1C}$  (Mikami y col. 1989; Biel y col. 1990),  $\alpha_{1D}$  (Seino y col. 1992; Williams y col. 1992a) y  $\alpha_{1F}$  (Bech-Hansen y col. 1998; Strom y col. 1998), los cuales median corrientes de tipo L. La subfamilia  $Ca_v2$  ( $Ca_v2.1$ - $Ca_v2.3$ ) incluye canales que contienen las subunidades  $\alpha_{1A}$  (Mori y col. 1991; Starr y col. 1991),  $\alpha_{1B}$  (Williams y col. 1992b; Dubel y col. 1992) y  $\alpha_{1E}$  (Niidome y col. 1992; Soong y col. 1993), que median las corrientes de tipo P/Q, N y R, respectivamente. La subfamilia  $Ca_v3$  ( $Ca_v3.1$ - $Ca_v3.3$ ) incluye canales conteniendo las subunidades  $\alpha_{1G}$  (Perez-Reyes y col. 1998),  $\alpha_{1H}$  (Cribbs y col. 1998) y  $\alpha_{1I}$  (Lee y col. 1999), que median corrientes de calcio de tipo T (*Tabla 1*).



Activación	Tipo de corriente		Subunidad	Distribución	Farmacología
HVA	L	Cav1.1	$\alpha 1S$	Músculo esquelético	Dihidropiridinas, verapamilo, diltiazem y $Cd^{2+}$
		Cav1.2	$\alpha 1C$	Células cromafines, SNC, músculo cardíaco, células endocrinas	
		Cav1.3	$\alpha 1D$	Células cromafines, dendritas, riñón, cóclea, oído	
		Cav1.4	$\alpha 1F$	Retina	
	P/Q	Cav2.1	$\alpha 1A$	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	$\omega$ -agatoxina IVA
	N	Cav2.2	$\alpha 1B$	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas	$\omega$ -conotoxina GVIA
	R	Cav2.3	$\alpha 1E$	Células cromafines, dendritas, terminales nerviosas, cuerpos celulares	SNX-482
LVA	T	Cav3.1	$\alpha 1G$	SNC	$Ni^{2+}$ , amilorida, mibefradilo y $Cd^{2+}$ (débilmente)
		Cav3.2	$\alpha 1H$	Células cromafines, neuronas, músculo cardíaco	
		Cav3.3	$\alpha 1I$	SNC	

**Tabla 1. Nomenclatura, distribución y farmacología de los distintos CCDV.** Los canales tipo T son activados por bajos voltajes (LVA), mientras que el resto son activados por altos voltajes (HVA). Los subtipos de canales detectados en las células cromafines son los P/Q, L, N y R.

A continuación, se muestra una breve descripción de los distintos subtipos de CCDV y de sus características biofísicas y farmacológicas.

### 5.2.1. Canales $Ca_v1$ (L)

Han sido los más caracterizados en células nativas no humanas o en sistemas heterólogos. Es el tipo de canales al que dedicaremos más atención en esta Tesis, por lo que en apartados posteriores volveremos a hablar de ellos.

Se encuentran ampliamente distribuidos en todas las células excitables y en la mayoría de las células no excitables. Se han detectado canales de esta subfamilia en la célula cromafín de vaca, (Albillos y col., 1993), rata (Gandía y col., 1995), ratón (Hernández-Guijo y col., 1998), cerdo (Kitamura y col., 1997),

gato (Albillos y col., 1994) y humano (Gandía y col., 1998; Pérez-Álvarez y col., 2008).

Constituyen la principal vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al músculo cardiaco y liso, y también controlan la liberación de hormonas y neurotransmisores en células endocrinas y algunas neuronas. Presentan un alto umbral de voltaje para su activación y se inactivan lentamente, por ello en un principio se denominaron de tipo L (“long lasting”). Cuatro subunidades  $\alpha_1$  distintas dan lugar a los canales  $\text{Ca}_v1.1$ ,  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v1.4$ ., correspondientes a las subunidades  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$  o  $\alpha_{1F}$ , cada uno de ellos presentando diferentes características.

Los subtipos  **$\text{Ca}_v1.2$**  y  **$\text{Ca}_v1.3$**  se expresan ampliamente en células neuronales y neuroendocrinas, así como en células excitables eléctricamente del sistema cardiovascular (Hell y col., 1993; Platzer y col., 2000; Namkung y col., 2001; Brandt y col., 2003; Mangoni y col., 2003). Ambos subtipos se encuentran en las mismas células en el cerebro (Hell y col., 1993), aurículas del corazón (Mangoni y col., 2003) o en las células del islote pancreático (Vignali y col., 2006). Aunque los  $\text{Ca}_v1.2$  son los más abundantes (Hell y col., 1993; Sinnegger-Brauns y col., 2004), los dos subtipos de canal difieren principalmente en su sensibilidad a las DHPs y en la dependencia de voltaje de su activación. Así, el subtipo  $\text{Ca}_v1.2$  presenta una mayor sensibilidad a DHPs que el  $\text{Ca}_v1.3$ . Al expresar de manera heteróloga la subunidad  $\text{Ca}_v1.3\alpha_1$  en rata o en humano se observa un bloqueo incompleto por las DHPs, y se ve que se activan a potenciales hiperpolarizados con respecto a los canales  $\text{Ca}_v1.2$  (Xu y Lipscombe, 2001; Koschak y col., 2001), característica también confirmada por nuestro grupo en sistemas nativos empleando ratones que carecen de la subunidad  $\text{Ca}_v1.3\alpha_1$  (Pérez-Álvarez y col., 2011). Los canales  $\text{Ca}_v1.3$  se activan a potenciales de membrana negativos (Platzer y col., 2000; Brandt y col., 2003). En relación a los canales  $\text{Ca}_v1.2$ , su voltaje de activación parece ser más negativo en las células nativas (Mangoni y col., 2003; Olson y col., 2005), o en sistemas heterólogos (Xu y Lipscombe, 2001; Koschak y col., 2001).

En la célula cromafín se ha visto que los canales  $\text{Ca}_v1$  contribuyen al disparo de los PAs espontáneos, principalmente el subtipo  $\text{Ca}_v1.3$  (Marcantoni y

col., 2010). Este subtipo de canal parece que media la liberación basal de neurotransmisor (Zhou y Misler, 1995). Además, se sabe que los canales  $Ca_v1$  están acoplados a los canales BK (Prakriya y Lingle, 1999), especialmente el subtipo  $Ca_v1.3$  (Marcantoni y col., 2010). Los canales  $Ca_v1$  controlan la liberación de neurotransmisores (López y col., 1994; Aldea y col., 2002; Polo-Parada y col., 2006) y se inhiben o potencian por neurotransmisores o segundos mensajeros (Albillos y col., 1996b; Carabelli y col., 2001; Cesetti y col., 2003).

En células tsA201 se ha visto que clones de  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  expresados de forma transiente pueden ser activados por PAs simples, pero las DHPs son débilmente efectivas en el bloqueo de estos canales cuando se emplea este protocolo para activarlos (Helton y col., 2005).

Funcionalmente, se ha visto que los canales  $Ca_v1$  no humanos están implicados en una gran variedad de procesos, incluyendo la secreción de catecolaminas (García y col., 1984), la endocitosis de las vesículas secretoras (Rosa y col., 2007), la actividad marcapasos y acoplamiento a los canales BK (Marcantoni y col., 2010; Pérez-Alvarez y col., 2011), y el proceso de acoplamiento excitación-contracción (Flucher y Franzini-Armstrong, 1996). Empleando ratones transgénicos con ablación de la subunidad  $Ca_v1.3\alpha1$ , se atribuyó la contribución de algunas subunidades específicas a esta subunidad, incluyendo la audición (Platzer y col., 2000), el control de la actividad marcapasos cardíaca y la velocidad del corazón (Platzer y col., 2000; Mangoni y col., 2003) y el desarrollo y la actividad presináptica de las células cocleares (Brandt y col., 2003). Los canales  $Ca_v1$  discriminan entre diferentes tipos de estímulos (potenciales excitatorios postsinápticos en preferencia a los PA), lo que es relevante para la señalización del factor de transcripción CREB (Mermelstein y col., 2000). Los canales  $Ca_v1$  también activan factores de respuesta a suero (Misra y col., 1994) y factores nucleares de células T (Graef y col., 1999). También ejercen importantes efectos sobre el destino celular (Brosenitsch y col., 1998; Cigola y col., 1998), sobre la orientación axonal y dendrítica (McAllister y col., 1996; Bishop y Milton, 1998), y sobre la potenciación y la depresión a largo plazo (Aniksztejn y Ben-Ari, 1991; Norris y col., 1998).

### **5.2.1.1. Farmacología de los canales Ca<sub>v</sub>1**

Su farmacología es de gran importancia debido al éxito alcanzado con fármacos bloqueantes de este tipo de canales en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (hipertensión arterial, enfermedades vasculares periféricas, etc.), neurológicas (vasoespamo, isquemia cerebral, infarto cerebral agudo, migraña, etc.), gastrointestinales, etc.

Se caracterizan por su sensibilidad a DHPs tanto agonistas (Bay K8644) como antagonistas (nifedipino, isradipino, nitrendipino, nisoldipino, nimodipino, flunaridipino) (Davies y Zamponi, 2008). Se unen a un dominio de alta afinidad a DHPs prolongando el tiempo de apertura del canal tras la repolarización de la membrana o bloqueando la entrada de Ca<sup>2+</sup> al interior celular (Davies y Zamponi, 2008; Hockerman y col., 1997; Striessnig y Koschak, 2008). También actúan como antagonistas de este tipo de canal las fenilalquilaminas y las benzotiazepinas (Catterall y col., 2005a y b). Otro compuesto que también potencia la corriente Ca<sub>v</sub>1, a través del enlentecimiento del cierre del canal es el benzopirrol FPL 64176, aunque también bloquea los canales de tipo Ca<sub>v</sub>2.2 (Liu y col., 2003).

Diferentes técnicas se han empleado para localizar los sitios de unión de estos compuestos al complejo del canal: mediante técnicas de fotoafinidad, de mapeo peptídico y la construcción de quimeras, se ha determinado que el sitio de unión de las DHPs como el nifedipino, el nimodipino o el isradipino reside en aminoácidos situados en el segmento S6 de los dominios III y IV, y en el segmento S5 del dominio III (Regulla y col. 1991; Catterall y Striessnig 1992; Kuniyasu y col. 1998; Kalasz y col. 1993).

Las fenilalquilaminas como el verapamilo, el gallopamilo o el devapamilo bloquean la corriente de tipo Ca<sub>v</sub>1 desde el lado intracelular de la membrana (Hescheler y col. 1982) y afectan a la unión de las DHPs mediante su interacción alostérica (Glossmann y Striessnig 1990). Concretamente el verapamilo se une al segmento S6 del dominio IV del canal (Schuster y col. 1996).

Las benzotiazepinas como el diltiazem, deben atravesar la membrana y, una vez en el citoplasma, alcanzan su receptor localizado en el interior del canal cuando éste se abre. Al igual que las fenilalquilaminas, las benzotiazepinas afectan a la unión de las DHPs mediante su interacción alostérica (Glossmann y Striessnig 1990). Se ha determinado que su unión se produce a los segmentos S6 de los dominios III y IV (Watanabe y col. 1993).

### 5.2.1.2. Inactivación de los canales $Ca_v1$

Los canales del grupo de alto umbral de activación (HVA) se inactivan por un doble mecanismo: de una manera dependiente de voltaje que puede observarse durante despolarizaciones prolongadas, y de manera dependiente de  $Ca^{2+}$ , producida por la entrada de iones  $Ca^{2+}$  a la célula durante la apertura del canal (Brehm y Eckert 1978). El mecanismo de inactivación de los canales  $Ca_v1$  se ha estudiado extensivamente. De hecho, es el tipo de canal que posee una mayor inactivación dependiente de  $Ca^{2+}$ . La mayoría de los autores describen la presencia de dos tipos de constantes en el curso de inactivación de estos canales: una rápida que correspondería a la inactivación dependiente de  $Ca^{2+}$ , y una lenta, correspondiente a la inactivación dependiente de voltaje. Esto se ha observado en varios tipos celulares, como células de músculo liso (Ganitkevich y col. 1986), miocitos ventriculares (Richard y col. 1993; Masaki y col. 1997) y neuronas (Cox y Dunlap 1994; Johnson y Byerly 1994).

***Inactivación dependiente de  $Ca^{2+}$***  (CDI, del inglés “calcium-dependent inactivation”)

Este mecanismo de inactivación fue descrito por primera vez en la fibra muscular gigante del artrópodo *Balanus nubilus* (Hagiwara y Nakajima, 1966), donde se vio que las contracciones musculares tras aplicar una fuerte despolarización, solamente se producían cuando la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular se encontraba reducida por la presencia de quelantes como el EDTA, el EGTA o el K-citrato. Estudios en otras células excitables corroboraron esta

hipótesis años después (Brehm y Eckert, 1978; Tillotson, 1979; Hagiwara y Byerly, 1981).

Este tipo de modulación se caracteriza por: 1) el mayor efecto de inactivación se observa a voltajes intermedios, lo que forma una típica curva en "U"; 2) el  $\text{Ca}^{2+}$  es más efectivo en promover la inactivación del canal frente a otros cationes divalentes; 3) se puede activar en respuesta al aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular tras una despolarización como en respuesta a un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

Inicialmente se reconoció como una propiedad de los canales de tipo  $\text{Ca}_v1$ , pero más tarde se observó también para otros subtipos. Se vio en los canales de tipo  $\text{Ca}_v2.2$  (Cox y Dunlap., 1994; Shirokov, 1999) y  $\text{Ca}_v2.1$  (Lee y col., 1999, 2000), e incluso en los canales  $\text{Ca}_v2.3$  (Jouvenceau y col., 2000), aunque a todos no afecta de igual manera. Así por ejemplo, en la célula cromafín, el canal de tipo  $\text{Ca}_v1$  presenta una inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  más lenta que la presentada por los canales  $\text{Ca}_v2.2$  y  $\text{Ca}_v2.1$  (Hernández-Guijo y col., 2001). Una característica de este tipo de inactivación en todos los canales de tipo HVA es la lenta inactivación que se produce de la corriente de  $\text{Ba}^{2+}$  comparada con la inactivación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En un principio se creía que este tipo de inactivación se debía a la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a un motivo que residía en la subunidad  $\alpha_1$  (de Leon y col., 1995; Bernatchez y col., 1998), pero una serie de estudios identificaron a la calmodulina (CaM) como el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de este fenómeno (Zühlke y col., 1999). La CaM es una proteína de 17 KDa que presenta cuatro sitios de unión para  $\text{Ca}^{2+}$ . La ocupación por  $\text{Ca}^{2+}$  de estos cuatro sitios produce un cambio notable de la conformación, de modo que la mayor parte de la molécula asume una estructura de hélice capaz de activar o inactivar sitios de fosforilación presentes en las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los CCDV (Wahl-Schott y col., 2006; Halling y col., 2006).

Los diferentes subtipos de CCDV se diferencian entre sí en cuanto a esta propiedad de inactivación por el propio  $\text{Ca}^{2+}$ , así por ejemplo, en la célula cromafín, el canal de tipo  $\text{Ca}_v1$  presenta una inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$

más lenta que la presentada por los canales  $Ca_v2.2$  (N) y  $Ca_v2.1$  (P/Q) (Hernández-Guijo y col., 2001).

### ***Inactivación dependiente de voltaje***

Este tipo de inactivación está presente en todos los CCDV conocidos, incluidos los de tipo  $Ca_v3$ .

Es un proceso poco conocido pero que puede observarse al comparar la corriente generada por una secuencia de dos pulsos de voltaje. Si el intervalo entre los pulsos es corto y no permite una recuperación del canal, la inactivación se aprecia como una disminución de la amplitud de la corriente durante el segundo pulso (Gutnick y col., 1989). Otra forma de observarse la inactivación por voltaje es cambiando el potencial de fijación de membrana a potenciales menos negativos (Villarroya y col., 1999).

Al igual que la CDI, la inactivación por voltaje parece afectar de diferente forma a los distintos subtipos de CCDV. Se puede observar una inactivación media, a bajos potenciales (en torno a -55 mV), que afecta principalmente a los canales tipo  $Ca_v2.2$  (N), y una segunda que afecta el componente mantenido de la corriente, inactivado a voltajes sobre -10 mV y que es sensible a DHP (canales  $Ca_v1$  (L)). También se ha descrito que los canales del tipo  $Ca_v2.2$  (N) no sufren inactivación por voltaje (Artalejo y col., 1992). A nivel de la célula cromafín, se ha demostrado que los canales  $Ca_v2.2$  (N) y  $Ca_v2.1$  (P/Q) son más susceptibles que los  $Ca_v1$  (L) a la inactivación por voltaje (Villarroya y col., 1999).

### **5.2.2. Canales $Ca_v2$ (no-L)**

Este tipo de canales se expresa predominantemente en neuronas y células neuroendocrinas como las  $\beta$ -pancreáticas (Ligon y col., 1998; Pereverzev y col., 2002), el músculo cardíaco (Weiergraber y col., 2000), los testículos (Lievano y col., 1996) y las células cromafines de la glándula adrenal (Albillos y col., 2000; Albillos y col., 1993; Albillos y col., 1996b; García-Palomero y col., 2000; García-

Palomero y col., 2001). Participan en la rápida liberación de neurotransmisores de las terminales nerviosas de sinapsis centrales y de motoneuronas de la unión neuromuscular (Jun y col., 1999; Gasparini y col., 2001; Qian y Noebels, 2001). Además de estar presentes en la membrana presináptica, los tres tipos de canales  $Ca_v2$  ( $Ca_v2.1$ ,  $Ca_v2.2$ ,  $Ca_v2.3$ ) también se expresan en las dendritas y en el soma celular (Yokoyama y col., 1995; Westenbroek y col., 1998). Debido a su amplia expresión en el cerebro de mamíferos y su papel crítico en la liberación de neurotransmisores, la ablación génica de los genes que codifican estos canales producen importantes alteraciones en la función cerebral, tal como ha podido observarse con la creación de diferentes transgénicos (Striessnig y Koschak, 2008).

Los canales  $Ca_v2.1$  (**canales P/Q**) se denominaron en un principio canales P/Q porque parecían ser dos canales diferentes. El primero, el canal P observado en células de Purkinje del cerebelo (Llinas y col., 1989a; Llinas y col., 1989b, Hillman y col., 1991) poseía una alta sensibilidad a FTX y a  $\omega$ -agatoxina IVA (Mintz y col., 1992a; Mintz y col., 1992b; Mintz 1994), ambas toxinas extraídas de la araña *Agelenopsis aperta*. El segundo canal, denominado Q, se diferenció farmacológicamente del anterior por su menor sensibilidad a  $\omega$ -agatoxina IVA (Wheeler y col., 1994; Randall y Tsien, 1995). Sin embargo, la evidencia de que la subunidad  $\alpha_{1A}$  constituía ambos canales llevó a considerarlos como una única entidad (Sather y col., 1993). Este canal se ha estudiado ampliamente en las células cromafines de la vaca, (Albillos y col., 1993; Albillos y col., 1996b; Albillos y col., 1996c; Artalejo y col., 1994) y se ha observado que su inactivación es dependiente de voltaje (Villarroya y col., 1999).

Los canales  $Ca_v2.2$  (**canales N**) se identificaron por primera vez en neuronas del ganglio dorsal del pollo (Nowycky y col., 1985). Se denominan así porque parecen ser específicos del sistema nervioso y de tejidos relacionados con éste, puesto que sólo se han descrito en células de origen neural (Wagner y col., 1988; Boland y col., 1994), en células cromafines (Bossu y col., 1991) y se ha observado que incrementan su expresión en células PC12 tratadas con el factor de crecimiento neuronal (Grantham y col., 1994). Se caracterizan porque precisan grandes despolarizaciones para su activación y se inactivan, aunque de forma



incompleta, a potenciales despolarizantes (Fox y col., 1987a y b; Plummer y col., 1989). Se inactivan más rápido que los canales  $Ca_v1$ , y de manera dependiente de voltaje (Artalejo y col., 1992; Villarroja y col., 1999; Fox y col., 1987a; Fox y col., 1987b). En células cromafines humanas nuestro grupo determinó que los canales  $Ca_v1$  y  $Ca_v2.3$  se activaban a potenciales de membrana 15-20 mV más negativos que los canales de tipo  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  (Pérez-Alvarez y col., 2008).

La mejor forma de caracterizarlos es mediante herramientas farmacológicas debido a su insensibilidad a las DHP y a su bloqueo por diferentes toxinas aisladas de caracoles marinos del género *Conus* como la  $\omega$ -conotoxina GVIA (Kerr y Yoshikami 1984; Olivera y col., 1984; Olivera y col., 1985; Kasai y col. 1987; McCleskey y col., 1987; Plummer y col., 1989; Aosaki y Kasai, 1989; Regan y col., 1991) y la  $\omega$ -conotoxina MVIIC (Hillyard y col., 1992; Martin-Moutot y col., 1995; McDonough y col., 1996; Gandía y col., 1997) que lo bloquean de manera irreversible, o las de efecto reversible  $\omega$ -conotoxina MVIIA (Valentino y col., 1993; Vega y col., 1995) y MVIID (Monje y col., 1993; Vega y col., 1995; Gandía y col., 1997).

Los canales  $Ca_v2.3$  se denominaron **de tipo R** porque en un principio fueron definidos como la corriente de  $Ca^{2+}$  residual que se observaba en tejidos neuronales tras el bloqueo de todos los otros subtipos de canales por DHPs,  $\omega$ -conotoxina GVIA,  $\omega$ -agatoxina IVA y  $\omega$ -conotoxina MVIIC (Randall y Tsien, 1995). Las corrientes generadas por este canal muestran una rápida cinética de inactivación (Randall y Tsien, 1995; Albillos y col., 2000). Se ha descrito el SNX-482, un péptido sintético derivado de una toxina de la tarántula *Hysteroocrates gigas*, como el primer bloqueante selectivo de los canales R (Newcomb y col., 1998); sin embargo, se ha demostrado que esta toxina también bloquea canales  $Ca_v2.1$  (P/Q) en células cromafines bovinas (Arroyo y col., 2003).

La existencia de este canal en las células cromafines ha sido objeto de discusión durante años, ya que se han observado diferencias en los resultados obtenidos por varios grupos de investigación. Parece que el motivo de esta polémica es el tipo de configuración de la técnica de "patch-clamp" empleada por cada laboratorio, ya que este tipo de corrientes se observan en la configuración

de parche perforado pero no en la de célula entera. Los primeros estudios sobre la dotación de canales de calcio de la célula cromafín de mamíferos como la vaca (Artalejo y col., 1991a; Artalejo y col., 1991b; Albillos y col., 1993; Artalejo y col., 1994; Albillos y col., 1996b), gato (Albillos y col., 1994), cerdo (Kitamura y col., 1997), ratón (Hernández-Guijo y col., 1998) y humano (Gandía y col., 1998) no detectaron este tipo de corriente empleando la configuración clásica de célula entera. Sin embargo, en estudios posteriores empleando la configuración de parche perforado, sí se detectó la corriente resistente (debida al canal  $Ca_v2.3$ ) en células cromafines de ratón, in situ y aisladas en cultivo (Albillos y col., 2000; Aldea y col., 2002), rata (Hollins y Ikeda, 1996; Cesetti y col., 2003; Carabelli y col., 2003) e incluso humano (Pérez-Alvarez y col., 2008). Esto sugiere que en las condiciones de célula entera al romperse la membrana se produce la diálisis de factores citosólicos necesarios para la actividad de este tipo de canal (Albillos y col., 2000).

#### **5.2.2.1. Farmacología de la subfamilia $Ca_v2$**

En general, los canales de esta subfamilia son relativamente insensibles a las DHPs y se bloquean específicamente y con gran afinidad por toxinas peptídicas de arañas y caracoles marinos (Miljanich y Ramachandran, 1995). Los canales  $Ca_v2.1$  se bloquean específicamente por  $\omega$ -agatoxina IVA, los  $Ca_v2.2$  por  $\omega$ -conotoxina GVIA y algunas toxinas relacionadas, y los  $Ca_v2.3$  por la toxina de tarántula SNX-482,  $Ni^{2+}$  y mibefradilo. Estos péptidos son potentes bloqueantes de la transmisión sináptica debido a su efecto específico en esta familia  $Ca_v2$ . Un péptido bloqueante del canal  $Ca_v2.2$  y derivado sintético de la  $\omega$ -conotoxina MVIIA, es el analgésico ziconotida, que se administra por vía intratecal en pacientes cuyo dolor ya no responde a opiáceos.

#### **5.2.3. Canales $Ca_v3$ (T)**

Se describieron por primera vez en neuronas sensoriales de vertebrados (Carbone y Lux, 1984), pero se han encontrado en una gran variedad de células excitables y no excitables. Se encuentran en tejido muscular, células neuroendocrinas y riñón (Pérez-Reyes, 1999). Hasta el momento se ha descrito

su presencia en células cromafines bovinas (Diverse-Pierluissi y col., 1991; García-Palomero y col., 2000), en las de rata adulta (Hollins e Ikeda, 1996; Novara y col., 2004; Carabelli y col., 2007) y en las de rata embrionaria (Bournaud y col., 2001; Levitsky y López-Barneo, 2009). Se ha demostrado que los canales T están altamente expresados en las etapas embrionarias y perinatales en las células cromafines, pero desaparecen durante la vida adulta. Las células cromafines adultas poseen ARNm para este canal (García-Palomero y col., 2000), pero éstos no son funcionales (Ceña y col., 1983; Carabelli y col., 1998). Sin embargo, se ha descrito que la elevación de los niveles de AMPc o la hipoxia favorecen la expresión de estos canales (del Toro y col., 2003; Novara y col., 2004; Carbone y col., 2006; Carabelli y col., 2007), llegando incluso a participar en la respuesta secretora (Giancippoli y col., 2006).

Se caracterizan por abrirse con una despolarización débil, mucho más negativa que la requerida por los demás CCDV (su umbral de activación está en torno a -70 mV) y por tener una rápida cinética de inactivación, por lo que se denominaron T (del inglés "transient"). La máxima corriente se alcanza a un potencial cercano a los -20 mV (Bossu y col., 1985; Fedulova y col., 1985), presentando una rápida inactivación dependiente de voltaje pero insensible a  $\text{Ca}^{2+}$  y una lenta desactivación (Marcantoni y col., 2008). Sus características les permiten mediar una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  y despolarización de membrana antes de que la célula alcance el potencial para disparar potenciales de acción. Gracias a esta característica, se han visto relacionados con la actividad rítmica (marcapasos) en el corazón y en algunas neuronas talámicas, la nocicepción, el control del tono vascular, la fertilización y la hipertrofia cardíaca.

Las subunidades  $\alpha 1\text{G}$  y  $\alpha 1\text{H}$  presentes en los canales T tienen los motivos característicos de un CCDV, incluida la estructura tetramérica, el sensor de voltaje S4 y la región P; sin embargo, les faltan otros motivos conservados en el resto de las subunidades  $\alpha 1$ , como el implicado en las interacciones con las subunidades  $\delta 1$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **5.2.3.1. Farmacología de la subfamilia Ca<sub>v</sub>3**

A nivel farmacológico, se distinguen de otros subtipos porque son más sensibles al bloqueo por el ión Ni<sup>2+</sup> que por el ión Cd<sup>2+</sup>, un bloqueante inespecífico de CCDV de alto umbral (Fox y col., 1987a). Son bloqueados, aunque de forma no selectiva, por octanol (Llinas y Yarom, 1986), amilorida (Tang y col., 1988), tetrametrina (Hagiwara y col., 1988), difenilhidantoina (Yaari y col., 1987) y por el antihipertensivo mibefradilo (Mishra y Hermsmeyer, 1994) y son resistentes a las DHPs.

## **5.3. SUBTIPOS DE CANALES DE CALCIO EN LA CÉLULA CROMAFÍN**

En los últimos 20 años, gracias sobre todo al empleo de las técnicas electrofisiológicas, muchos estudios han ayudado a conocer el porcentaje de cada tipo de CCDV en las células cromafines de gran variedad de especies animales, incluida la humana. En la célula cromafín se expresan los cinco subtipos de canales de alto umbral: los Ca<sub>v</sub>1 (Hoshi y Smith, 1987; Bossu y col., 1991; Albillos y col., 1994; Pérez-Alvarez y col., 2008), los Ca<sub>v</sub>2.2 (Hans y col., 1990; Bossu y col., 1991; Artalejo y col., 1992; Albillos y col., 1994; Pérez-Alvarez y col., 2008), los Ca<sub>v</sub>2.1 (Albillos y col., 1993; Gandía y col., 1993; Artalejo y col., 1994; López y col., 1994; Pérez-Alvarez y col., 2008) y los Ca<sub>v</sub>2.3 (Albillos y col., 2000; García-Palomero y col., 2000; Pérez-Alvarez y col., 2008). Pero los diferentes subtipos pueden coexistir en una misma célula y su expresión varía entre especies. Se ha podido observar que la proporción de los distintos subtipos de CCDV es muy diferente si comparamos entre unas especies y otras (Gandía y col., 1998; Pérez-Alvarez y col., 2008) e incluso que existen diferencias en la proporción de canales dentro de un mismo cultivo celular (Pérez-Alvarez y col., 2008). No conocemos aún la relevancia fisiológica de la existencia de estas diferencias entre especies, pero seguramente tenga claras consecuencias sobre el control diferencial de la exocitosis en respuesta a diferentes tipos de estrés.

Los experimentos realizados en la configuración de célula entera de la técnica de "patch-clamp" han determinado que el canal del subtipo Ca<sub>v</sub>1 (L)

representa cerca de un 15-20% del total de los CCDV en la célula cromafín humana (Gandía y col., 1998), bovina (Albillos y col., 1993; Gandía y col., 1993) y porcina (Kitamura y col., 1998); sin embargo, constituye el 50% en células cromafines de gato (Albillos y col., 1994), rata (Gandía y col., 1995) y ratón (Hernández-Guijo y col., 1998).

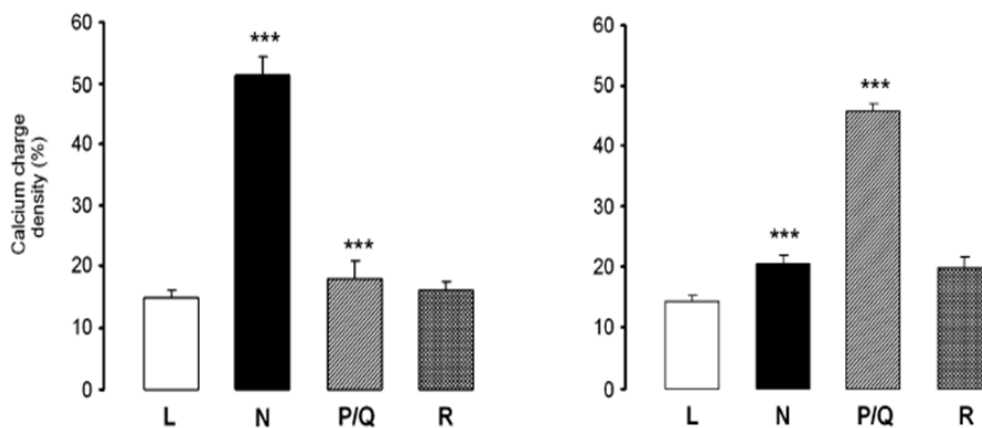
El canal tipo  $Ca_v2.2$  también muestra gran variabilidad entre especies. En el cerdo representa un 80% de la corriente (Kitamura y col., 1998), en el gato un 45% (Albillos y col., 1994); mientras que en vaca (López y col., 1994), rata (Gandía y col., 1995), ratón (Hernández-Guijo y col., 1998) y humano (Gandía y col., 1998) la fracción de la corriente tipo N es un 30% de la corriente total (fracción que por ejemplo en humano depende de la población celular estudiada).

De igual manera, el canal tipo  $Ca_v2.1$  presenta diferencias interespecíficas. La fracción de corriente a través de los canales P/Q es del 50% en células cromafines bovinas (Albillos y col., 1996c) y hasta de un 60% en células cromafines humanas (Gandía y col., 1998); pero en cromafines de gato esta proporción desciende a un 5% (Albillos y col., 1994) al igual que en cerdo (Kitamura y col., 1998). En cromafines de rata (Gandía y col., 1995) y de ratón (Hernández-Guijo y col., 1998) el canal P/Q representa un 20 y 30% respectivamente de la corriente total.

En cuanto al canal  $Ca_v2.3$ , es menos lo que se conoce de él, ya que no fue hasta la introducción de la configuración de parche perforado de la técnica de "patch-clamp" cuando se halló en las células cromafines. El porcentaje de este tipo de canal representa el 22% en ratón (Albillos y col., 2000) y el 18% en humano (Pérez-Alvarez y col., 2008).

Se ha visto que la proporción de canales en la célula cromafín puede variar incluso dentro del mismo cultivo celular y existir diferencias entre poblaciones celulares. Concretamente nuestro grupo de investigación publicó en 2008 un trabajo realizado en células cromafines humanas, en el que empleando la configuración de parche perforado se determinaba la existencia de dos poblaciones celulares diferenciadas según la contribución predominante del canal

Ca<sub>v</sub>2.1 o Ca<sub>v</sub>2.2 a la corriente total de Ca<sup>2+</sup> (Ilustración 11). Así, mientras que en el grupo denominado como "grupo N" los canales Ca<sub>v</sub>2.2 y Ca<sub>v</sub>2.1 contribuían un 51.4 y un 18%, respectivamente, en el otro grupo ("grupo P/Q") estos valores eran 20.4 y 45.6%, respectivamente. Sin embargo, la contribución de los canales Ca<sub>v</sub>1 y Ca<sub>v</sub>2.3 no variaba entre estos dos grupos celulares, representando un 15% y un 18%, respectivamente. Como los neuromoduladores pueden afectar de forma diferencial a los diferentes subtipos de CCDV (Mogul y col., 1993; Wu y Saggau., 1994; Tsien y col., 1995; Scholz y Miller., 1996) esta particular distribución de canales podría permitir una regulación diferencial a nivel celular de la entrada de Ca<sup>2+</sup> y de la respuesta secretora (Pérez-Alvarez y col., 2008).



**Ilustración 11. Contribución de los diferentes subtipos de CCDV a la corriente de Ca<sup>2+</sup> en células cromafines de la médula adrenal humana.** Puede verse claramente la existencia de dos grupos celulares según la contribución predominante del canal P/Q o N a la corriente total de Ca<sup>2+</sup>. \*\*\*p<0.001, respecto al mismo canal en el otro grupo celular (Pérez-Alvarez y col., 2008).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN**

Se realizaron experimentos en células cromafines de dos cepas de ratones transgénicos: una que carecía de la subunidad  $Ca_v1.3\alpha1$  ( $Ca_v1.3^{-/-}$ ) (Platzer y col., 2000), y la otro carente de la alta sensibilidad a DHPs de la subunidad  $Ca_v1.2\alpha1$  ( $Ca_v1.2$  DHP $^{-/-}$ ) (Sinnegger-Brauns y col., 2004).

#### **1.1. Obtención de los animales transgénicos**

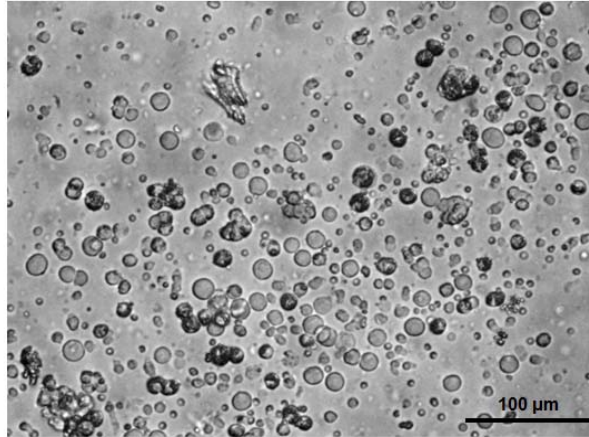
La generación y caracterización de los ratones  $Ca_v1.3^{-/-}$  y  $Ca_v1.2$  DHP $^{-/-}$  ha sido descrita previamente (Platzer y col., 2000; Sinnegger-Brauns y col., 2004). Los animales nos los cedió el profesor Striessnig, de la Universidad de Innsbruck, Austria. Una vez en el animalario de nuestra facultad, estas líneas se cruzaron con ratones C57BL/6J y se reprodujeron tras la transferencia de embriones a madres libres de patógenos (SPF) para eliminar la infección del virus de la hepatitis murina (MHV) que traían desde el origen.

#### **1.2. Procedimiento de aislamiento y cultivo de las células cromafines de ratón**

Los animales se manejaron de acuerdo con las guías éticas de manejo de animales utilizadas en nuestra universidad. Se sacrificaron por dislocación cervical y se abrió la cavidad peritoneal, tras lo cual se pudieron extraer las glándulas. Una vez extraídas se colocaron en una placa Petri con solución Locke mantenida en hielo para proceder a su posterior disección. Bajo la lupa y con ayuda de un bisturí y las pinzas se retiraron el tejido graso y la corteza, dejando sólo las médulas. Éstas se incubaron durante 27 min en una solución con papaína (25 U/ml) a 37°C. Después de este tiempo, se lavaron con Locke, y se añadió medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 5%. La digestión mecánica se realizó con una pipeta hasta obtener



una solución homogénea. Finalmente las células se sembraron en cubres de vidrio previamente tratados con poli-D-lisina (0,1 mg/ml) para facilitar la adhesión de las mismas y se introdujeron en un incubador con una atmósfera saturada de agua, 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 1 h se añadieron otros 50µl de medio a cada pocillo y se dejaron hasta su uso en el incubador (*Ilustración 12*).



**Ilustración 12. Microfotografía de un cultivo de células cromafines de ratón.** Puede verse la apariencia redondeada de las células y su tendencia a agruparse en pequeños grupos, imitando la situación que ocurre fisiológicamente en la médula adrenal.

## 2. OBTENCIÓN, AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES HUMANAS

### 2.1. Obtención de las glándulas adrenales humanas

Las glándulas adrenales humanas se obtuvieron de sujetos sanos que cumplían los requisitos para ser donantes de órganos. Para su obtención y empleo en investigación cumplimos los siguientes requisitos éticos, legales y administrativos:

1. La aprobación de los Comités Éticos del Hospital Universitario Ramón y Cajal, del Hospital Universitario La Paz, del Hospital Clínico San Carlos, del Hospital 12 de Octubre, de la Fundación Jiménez Díaz y de la Universidad Autónoma de Madrid.
2. El consentimiento informado de los familiares de los donantes.

Para posibilitar la obtención de un tejido adrenal viable, en coordinación con nuestros colaboradores en estos hospitales, establecimos un dispositivo de alerta temprana activo las 24 horas del día, consistente en varios puntos:

- a)** La existencia de soluciones Locke de preservación estériles y a 4°C de temperatura, en los hospitales colaboradores. La composición de esta solución (en mM) era: 154 NaCl, 5.6 KCl, 3.6 NaHCO<sub>3</sub>, 5 HEPES, 10 glucosa, pH 7.2.
- b)** El aviso urgente (vía teléfono móvil) de la inminente extracción de órganos de un donante con el fin de proceder a su recogida con la menor demora posible tras la extracción.
- c)** La inmediata introducción de las glándulas extraídas en dichos envases conteniendo solución de preservación fría (en quirófano).
- d)** La recogida en un periodo de 1 hora de las glándulas extraídas y transporte en hielo hasta nuestro laboratorio en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.
- e)** Procesado de las glándulas en campana de flujo laminar de nuestra unidad de cultivos para proceder al aislamiento y sembrado de las células cromafines de la médula adrenal.

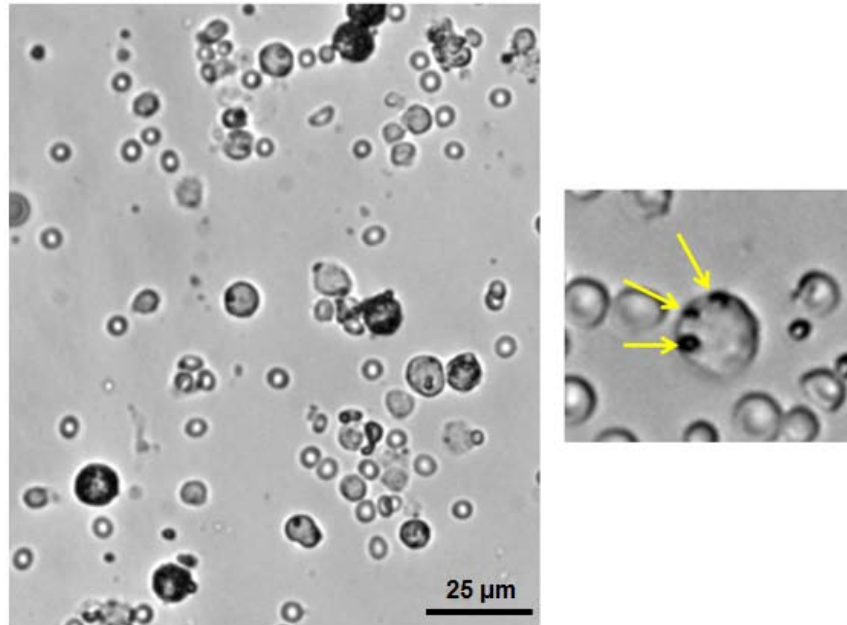
Para los estudios realizados en esta Tesis hemos requerido de donaciones de glándulas adrenales en condiciones aptas para el cultivo de las células cromafines. Era esencial que las glándulas se encontraran intactas, ya que los cortes que afectaran a la parte interna de la glándula las hacían inservibles. En algunas ocasiones, los cirujanos que colaboraban con nosotros apuntaron que existió cierta dificultad para la extracción íntegra de la glándula adrenal derecha debido a su localización más interna cerca de la vena cava. De hecho, bastantes veces sólo nos podían dar una de las glándulas porque la otra quedaba inservible. Los donantes de ambos sexos fallecieron por hemorragia cerebral aunque según el protocolo de actuación, sus órganos permanecieron adecuadamente

perfundidos hasta su extracción. Los experimentos mostrados en esta Tesis se obtuvieron de 23 glándulas. La edad media de los donantes fue de  $54 \pm 7$  años (rango 24-70 años).

## **2.2. Procedimiento de aislamiento y cultivo de las células cromafines humanas**

El protocolo utilizado para aislar las células cromafines de la médula adrenal fue el de digestión de la médula con colagenasa descrito por Livett en 1984 (Livett, 1984) con modificaciones introducidas por nuestro grupo (Pérez-Alvarez y Albillos., 2007). Las glándulas se depositaron desde su extracción en la solución de preservación Locke. Una vez en nuestro laboratorio, y siempre bajo campana, se procedió a retirar el abundante tejido adiposo circundante. Para eliminar restos de tejido y eritrocitos del sistema vascular de la glándula, se perfundió retrógradamente Locke a través de la vena suprarrenal y a continuación solución con proteasa tipo XIV al 1%. Posteriormente, las glándulas se sumergieron en Locke a 37°C durante 10 min. Pasado este tiempo se repitió otra vez la operación. A continuación se practicó un corte sagital a la glándula dejando al descubierto la médula, de color blanquecino, distribución irregular y entrelazada con la corteza. La separación de la médula se realizó con la punta de un bisturí, seccionando y raspando las partes más adheridas a la corteza. Los fragmentos de médula se trocearon sobre una solución de colagenasa tipo I (1 mg/ml). Estos fragmentos se mantuvieron en la solución enzimática durante 30 min a 37°C, agitando cada 5 min con una pipeta Pasteur para facilitar la disgregación tisular. La suspensión obtenida se filtró a través de una malla estéril de 200  $\mu\text{m}$  que permitió eliminar fragmentos de médula no digeridos y se centrifugó durante 10 min a 1100 rev/min. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en Locke, procediendo a una nueva centrifugación a 600 rev/min durante 10 min. Este proceso se repitió una vez más para asegurar un buen lavado de la enzima. En caso de ver un buen pellet, esta suspensión se pasaba por una malla estéril de 80  $\mu\text{m}$ , pero si no directamente se pasaba a una solución con albúmina bovina disuelta al 0.4%, centrifugando durante 10 min a 600 rev/min. El pellet se resuspendió en DMEM con 5% de suero fetal bovino. Se realizó una última centrifugación, empleando 200  $\mu\text{l}$  para la resuspensión del pellet. Las células se

sembraron en cubreobjetos de vidrio pretratados con poli-D-lisina y se introdujeron al incubador con atmósfera saturada de agua, 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras 1 h se añadieron otros 500  $\mu$ l de medio a cada pocillo y se dejaron hasta su uso (*Ilustración 13*).



**Ilustración 13. Microfotografía de un cultivo de células cromafines humanas.** Prestar atención a la apariencia redondeada y la presencia de lo que parecen restos de botones sinápticos (no lo podemos confirmar) que permanecen encima de estas células (flechas amarillas).

### 3. MEDIDA DE LAS CORRIENTES IÓNICAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE PATCH-CLAMP

#### 3.1. La técnica de “patch-clamp”

Para la medida de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> y de capacidad se empleó la técnica de “patch-clamp” (Hamill y col., 1981). Esta técnica que se ha traducido como técnica del “pinzamiento de un parche de membrana”, permite fijar el voltaje de la célula y medir las corrientes iónicas que atraviesan su membrana. Se trata de incluir a la célula de estudio en un circuito eléctrico que está conectado a un amplificador (*Ilustración 14*). Asumiendo que se cumple la ley de Ohm ( $I=V/R$ ), en este circuito los cambios de voltaje son proporcionales a los cambios en la corriente, siendo la constante de proporcionalidad la resistencia de la membrana.

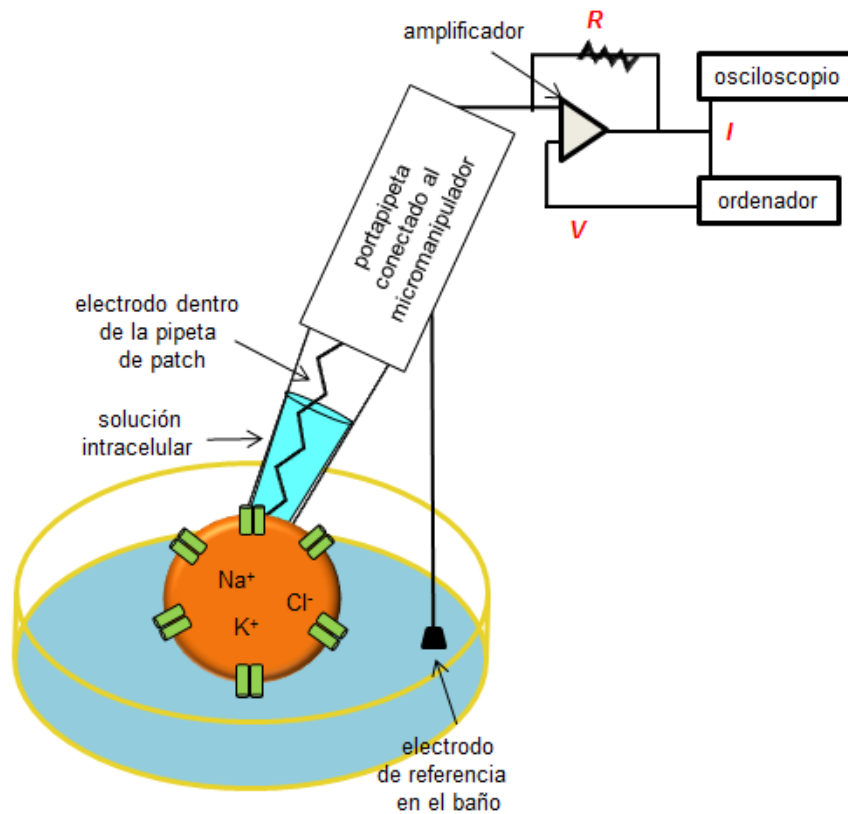


Ilustración 14. Representación esquemática de la técnica de “patch-clamp”.

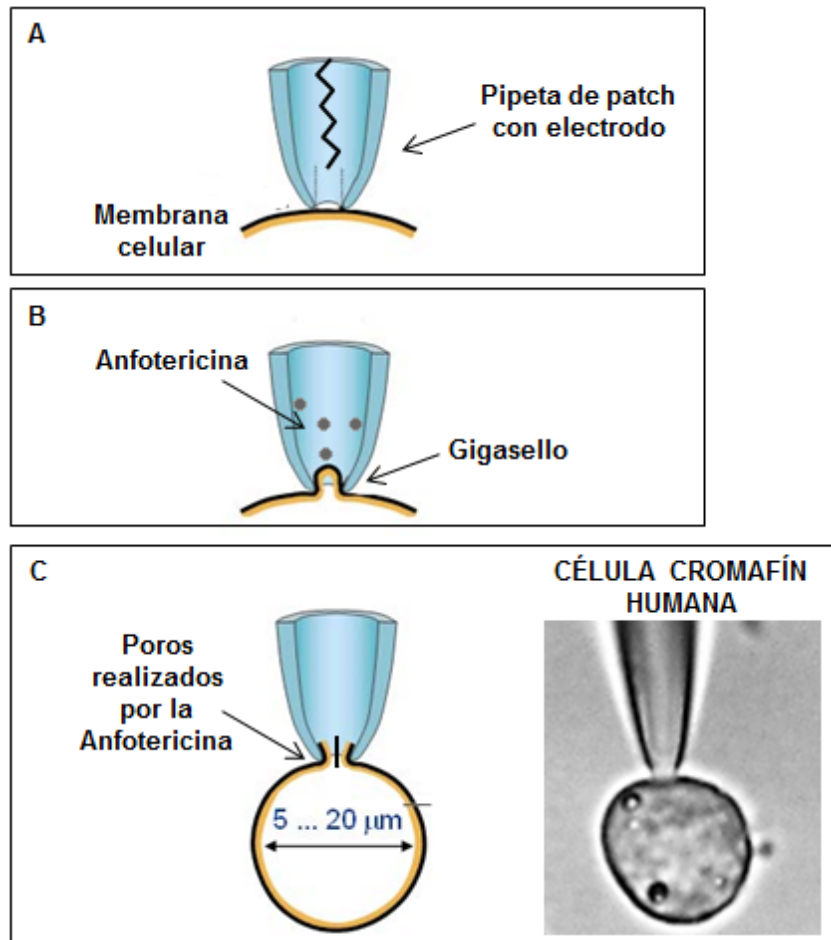
En el trabajo que se presenta aquí empleamos dos modalidades de esta técnica: fijación de voltaje (voltaje-clamp, VC) y fijación de corriente (current-clamp, CC). El modo VC permite medir las corrientes que atraviesan la membrana. En este modo, el amplificador mantiene “fijado” el voltaje del circuito. Si en respuesta a un determinado estímulo se produce alguna corriente de iones a través de los canales y/o receptores presentes en dicho parche, el amplificador se encargará de “compensar” eléctricamente este flujo. Sin embargo, el modo CC nos permite detectar los cambios en la diferencia de  $V_m$  que las corrientes de la célula producen.

### 3.2. Registros electrofisiológicos en parche perforado

La técnica de “patch-clamp” consiste en la formación de un sello entre la membrana celular y la pipeta de vidrio dentro de la cual va el electrodo de registro que conduce los cambios eléctricos a un amplificador de voltaje. La punta de

vidrio, llena de la solución adecuada, se aproxima a la membrana de la célula, presionando contra ella y aplicando succión para absorber la membrana dentro de la pipeta y formar este sello de alta resistencia (superior al GigaOhm) que asegura que la mayoría de corrientes originadas en el parche de membrana fluyan hacia el interior de la pipeta y de allí al circuito de medida de corriente.

Los experimentos presentados en esta Tesis se realizaron mediante la configuración de parche perforado de esta técnica (Korn y Horn, 1989; Gillis y col., 1991). Es una modalidad menos invasiva y más estable que otras configuraciones como la célula entera ya que se evita la succión para romper el parche de membrana. Además, el parche perforado permite obtener registros de más de 1 h de duración en una misma célula, resultando de especial utilidad para estudiar procesos celulares que sean dependientes de componentes intracelulares pues éstos no sufren un proceso de “lavado” o diálisis como ocurre en célula entera. Esta configuración se obtiene por la inclusión de un agente antibiótico o antifúngico (en nuestro caso, anfotericina-B) en la solución del interior de la pipeta de patch. Las moléculas de antibiótico se difunden dentro de la membrana fijada en pequeñas perforaciones y proveen acceso eléctrico al interior de la célula (*Ilustración 15*).



**Ilustración 15. Representación esquemática de la realización de un sello en la técnica de "patch-clamp".** Para obtener un sello se aproxima la punta de la pipeta con un micromanipulador a la célula enfocada con el microscopio (A). Una vez que la pipeta toca suavemente la membrana se realiza una succión hasta que se logra que la membrana obture la punta de la pipeta (B). Se logra así un sello de varios  $\Omega$  de resistencia, a través del cual la única corriente de iones que pasa es la mediada por los canales iónicos situados justo en la zona del sello. Añadiendo a la solución de la pipeta un antifúngico, como por ejemplo la anfotericina-B, se consigue crear poros en la membrana que sólo permitirán el paso de pequeños iones (C), impidiendo que la célula pierda grandes moléculas necesarias para su correcto funcionamiento, pero permitiendo la medida de corrientes y voltajes transmembrana. En la parte derecha del panel C se muestra la microfotografía de un sello realizado en una célula cromafín humana.

Para el registro simultáneo de corrientes iónicas y de la capacidad de la membrana ( $C_m$ ) se fabricaron pipetas a partir de capilares de borosilicato con ayuda de un estirador horizontal de vidrio (PP-830, Narishige, Tokio, Japón), se cubrieron parcialmente de cera (para eliminar la capacidad debida a la pipeta) y finalmente se pulieron con ayuda de una microforja (MF-830, Narishige) hasta

obtener un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  y una resistencia de 2-3  $\text{M}\Omega$  una vez rellenas con la correspondiente solución intracelular. Los registros y la adquisición de datos se realizaron a través de un amplificador de “patch-clamp” EPC-10 y del programa PULSE (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania).

Se realizaron registros de la capacidad eléctrica de la membrana celular ( $C_m$ ) como medida indirecta para el estudio de la secreción (exocitosis) y retirada de membrana (endocitosis) debido a la propiedad de la membrana de actuar como un condensador, que consiste en un aislante (la membrana) separando dos conductores (el citosol y la solución extracelular), y como tal es capaz de almacenar carga cuando se le somete a una diferencia de potencial en un circuito. La cantidad de carga que almacena un condensador es proporcional a la superficie del aislante. En el caso de la célula, un incremento de la superficie, como el que ocurre tras la adición de la membrana de las vesículas durante la exocitosis, se traduce en un aumento de  $C_m$ , y a continuación, se puede observar una caída del registro de  $C_m$ , indicándonos la existencia de un proceso endocitótico (Neher y Marty., 1982). Para estimar estos cambios, utilizamos la técnica desarrollada por Lindau y Neher (Lindau y Neher, 1988), basada en la aplicación de una onda sinusoidal de voltaje a la membrana de una amplitud de pico a pico de 70 mV, a 1 kHz de frecuencia, sobre el potencial de fijación ( $V_h$ ) de -80 mV (o -50 mV en algunos de los experimentos de esta Tesis). Esto nos permite simultanear el registro de los cambios de capacidad con los registros de corrientes iónicas.

Para estudiar la exocitosis hemos llevado a cabo protocolos experimentales en los que se registraba  $C_m$  antes y después de la aplicación del estímulo. La exocitosis ha sido medida como la diferencia entre el valor  $C_m$  antes y después del estímulo aplicado.

Sólo se aceptaron registros en los que la fuga de la corriente era menor de 20 pA. Sin embargo, las células registradas en la modalidad de fijación de corriente (CC) que exhibían PAs espontáneos (sin inyección de corriente) sólo se incluyeron en el análisis cuando la fuga era menor de 10 pA.



Los cubreobjetos con las células se depositaron sobre una cámara de metacrilato que contenía solución extracelular, dispuesta sobre la platina de un microscopio invertido. Una vez enfocada la célula objeto de estudio, se perfundió solución extracelular por medio de una pipeta con varias puntas de aguja conectadas a distintos reservorios controlados por válvulas electrónicas (The Lee Company, Essex, Reino Unido) controladas por un controlador de electroválvulas de fabricación casera. Esta pipeta se posicionó a unos 50-100  $\mu\text{m}$  de la célula permitiendo el cambio de soluciones en unos 100 ms. El nivel del fluido del baño se controló por un sistema de fibra óptica acoplado a una bomba que retira el exceso de líquido.

Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ( $\approx 25\text{ }^\circ\text{C}$ ).

### 3.3. Soluciones empleadas

Para los registros electrofisiológicos se emplearon diferentes soluciones extracelulares e intracelulares dependiendo del experimento:

-Para la medir las **corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$** , la composición de la solución externa era (en mM): 5  $\text{CaCl}_2$ , 100  $\text{NaCl}$ , 45  $\text{TEACl}$ , 5.5  $\text{KCl}$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 d-tubocurarina, 0.002 TTX, 0.0002 apamina, 10 HEPES y 10 glucosa. El pH se ajustó a 7.4 con  $\text{NaOH}$ . Todos los fármacos utilizados se disolvieron en esta solución para su aplicación. La solución intracelular llevaba (en mM): 145  $\text{Cs-glutamato}$ , 8  $\text{NaCl}$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES y 0.5 anfotericina-B (pH 7.2).

-Para la medida de las **corrientes de  $\text{K}^+$**  o para los **experimentos de "AP-clamp"** en los que se estimulaba a la célula con PAs en la configuración de fijación de voltaje, y para el **registro de PAs** en la configuración de fijación de corriente, la composición de la solución externa (que en ocasiones denominaré Tyrode) era (en mM): 2  $\text{CaCl}_2$ , 145  $\text{NaCl}$ , 5.5  $\text{KCl}$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7.4). La solución intracelular contenía (en mM): 145  $\text{K-glutamato}$ , 8

NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 0.5 anfotericina-B (pH 7.2). Para los experimentos de medidas de corrientes de K<sup>+</sup> la resistencia en serie se compensó un 80%, 10  $\mu$ s.

Diariamente se preparó una solución madre de **anfotericina-B** (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 50 mg/ml diluida en dimetilsulfóxido (DMSO) sonicándola hasta su completa solubilización protegida de la luz. A partir de esta solución madre se obtenía la concentración final sonicándola también protegida de la luz y del calentamiento hasta su completa homogenización; esta solución se mantenía en frío y se empleaba en el plazo de unas 2 h para asegurar que no se hubiese perdido la actividad del antifúngico.

Las puntas de las pipetas de vidrio empleadas se sumergieron en solución intracelular sin anfotericina-B y luego se rellenaron por el otro extremo con la solución de anfotericina (de este modo se podía conseguir la configuración antes de que el antifúngico hubiese difundido hacia la punta de la pipeta para empezar a formar los poros en la membrana, lo que dificultaría la obtención del sello). Generalmente, tras unos 5-15 min se alcanzó una resistencia de acceso menor de 20 M $\Omega$  que permitió una buena fijación del V<sub>m</sub> para iniciar el registro electrofisiológico.

Para caracterizar farmacológicamente los CCDV, se emplearon los siguientes compuestos:

- Nifedipino e isradipino (diferentes concentraciones) para bloquear los canales Cav1,
- $\omega$ -conotoxina GVIA ( $\omega$ -CTX-GVIA) 1  $\mu$ M para bloquear los canales tipo Cav2.2,
- $\omega$ -conotoxina MVIIC ( $\omega$ -CTX-MVIIC) 3  $\mu$ M para bloquear los Cav.2.1 y Cav2.2,
- $\omega$ -Agatoxina IVA ( $\omega$ -Aga-IVA) 200 nM para bloquear los Cav2.1,
- SNX-483 300 nM para bloquear los Cav2.3.

Todas estas toxinas se compraron a Peptide Institute Inc., Osaka, Japon, excepto nifedipino e isradipino que se compraron en Sigma-Aldrich (Madrid, España).

#### **4. INMUNOCITOQUÍMICA EN CÉLULAS CROMAFINES PARA LAS SUBUNIDADES $Ca_v1.1$ , $Ca_v1.2$ , $Ca_v1.3$ , Y $Ca_v1.4$**

Los cubreobjetos que contenían las células cromafines (humanas o de ratón) se lavaron con una solución salina con fosfato (PBS) y a continuación se fijaron en 3.5% de p-formaldehído diluido en esta misma solución durante 20 min. Después de lavar varias veces, las células se permeabilizaron con Tritón 0.1% durante 15 min. De nuevo se lavaron los cubres con PBS y se incubaron con el potenciador "Image Enhancer IT-FX" (Molecular Probes, Barcelona, España) durante 30 min. Tras este tiempo, los cubres de nuevo se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente durante 3 h a 25°C. Los anticuerpos primarios empleados (en una dilución 1:200) eran los policlonales de cabra anti- $Ca_v1.1$  y anti- $Ca_v1.4$  (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Alemania), y los policlonales de conejo anti- $Ca_v1.2$  y anti- $Ca_v1.3$  (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Tras esta incubación, los cubres se volvieron a lavar y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 45 min. Los anticuerpos secundarios empleados eran Alexa Fluor-594 (en una dilución 1:200, Molecular Probes, Barcelona, España), de cabra dirigido a conejo (para marcar  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ ) y de conejo dirigido a cabra (para marcar  $Ca_v1.1$  y  $Ca_v1.4$ ). Se realizaron controles de pre-adsorción empleando antígenos control para cada anticuerpo primario empleado, lo que efectivamente impedía el marcaje de nuestras muestras descartando así la posibilidad de un marcaje no específico. Tras montar los cubres en los portaobjetos, la fluorescencia se determinó en un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

#### **5. ANÁLISIS DE DATOS**

El análisis de los experimentos se llevó a cabo mediante los programas IGOR Pro (Wavemetrics Inc., Oregon, USA) y PULSE. En todos se realizó la

sustracción de la corriente y/o de la  $C_m$  registradas al profundir 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  a todos los trazados para eliminar la posible corriente debida a la fuga.

La dependencia de voltaje de la activación se determinó de las curvas de conductancia normalizada ( $G/G_{\text{max}}$ ) frente a voltaje, las cuales se ajustaron según la ecuación siguiente (ecuación 1):

$$G/G_{\text{max}} / G_{-50} = G_{\text{max}} + \{1/1 + \exp [(V_{1/2} - V)/k]\},$$

donde  $G$  es definida como  $I_{\text{peak}}/(V - E_{\text{rev}})$ ,  $G_{-50}$  es el valor de  $G$  obtenido a -50 mV,  $G_{\text{max}}$  es el máximo valor de  $G$  alcanzado,  $V_{1/2}$  es el voltaje para la mitad de la activación máxima, y  $k$  el factor de la función de Boltzmann.

A menos que se indique otra cosa, los datos se muestran como la media  $\pm$  SEM (error estándar de la media, definido como la desviación estándar entre la raíz del número de datos).

Los datos se compararon utilizando el test  $t$  de Student pareado (cuando se compararon valores antes y después de un tratamiento en la misma célula) o no pareado (cuando se compararon valores de diferentes células).

## **RESULTADOS**

La investigación en la que se basa esta Tesis se centra en el estudio de los canales de tipo  $Ca_v1$ . A continuación paso a mostrar los los experimentos realizados sobre este tipo de canal en las células cromafines de la glándula adrenal de ratón, con sus correspondientes resultados, discusión y conclusiones, y después haré lo mismo con la parte realizada en las células cromafines humanas. Los materiales y métodos empleados en ambos estudios, por ser en su mayoría similares, aparecen agrupados en la sección de "materiales y métodos" de la Tesis.

Para una mayor claridad en la lectura de los siguientes apartados, las Figuras del trabajo de ratón se nombrarán como "*Figura ratón*" seguido del número y de la letra del panel correspondiente, y las del estudio de humano se nombrarán de igual manera pero poniendo "*Figura humano*".

**PARTE I. EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN**

## RESULTADOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN

El conjunto de experimentos y resultados obtenidos en las células cromafines de ratón aparece publicado en la revista "Journal of Neurochemistry" con el título "Different roles attributed to  $Ca_v1$  channel subtypes in spontaneous action potential firing and fine tuning of exocytosis in mouse chromaffin cells". (Pérez-Alvarez y col., 2011). A continuación voy a mostrar los resultados de dicho estudio.

Estudiamos las isoformas de canales de tipo  $Ca_v1$  expresadas en las células cromafines de ratón para conocer el papel de estos subtipos en la excitabilidad y en la exocitosis en las células cromafines de ratón. Para ello, llevamos a cabo técnicas de inmunocitoquímica y de "patch-clamp" en células cromafines de la médula suprarrenal de dos cepas de ratones transgénicos: una carente de la subunidad  $Ca_v1.3\alpha1$  ( $Ca_v1.3^{-/-}$ ) (Platzer y col., 2000), y la otro carente de la alta sensibilidad a DHP de la subunidad  $Ca_v1.2\alpha1$  ( $Ca_v1.2DHP^{-/-}$ ) (Sinnegger-Braun y col., 2004).

### **1. Los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ son los subtipos de canales $Ca_v1$ expresados en las células cromafines de ratón.**

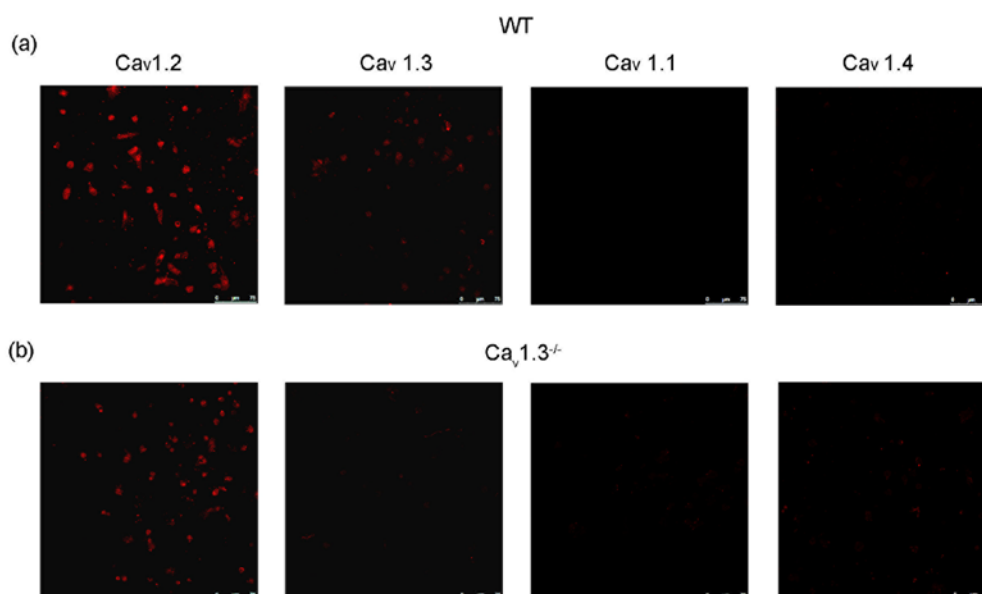
Los primeros experimentos que realizamos se diseñaron para determinar los subtipos de canal  $Ca_v1$  expresados en estas células, para ello empleamos la técnicas de inmunocitoquímica, así como experimentos que probaban la sensibilidad a DHPs.

#### ***Caracterización inmunocitoquímica de los subtipos de canales $Ca_v1$***

Empleamos anticuerpos frente a los diferentes subtipos de canal  $Ca_v1$  ( $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v1.4$ ) en las células cromafines de ratones WT y en células del tipo  $Ca_v1.3^{-/-}$ . En las células WT se observó marcaje de las células con anticuerpos frente a  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ , pero no frente a los canales  $Ca_v1.1$  y  $Ca_v1.4$  (*Figura ratón 1a*). En las células del tipo  $Ca_v1.3^{-/-}$ , sólo se observó marcaje de los



anticuerpos para  $Ca_v1.2$  (Figura ratón 1b).

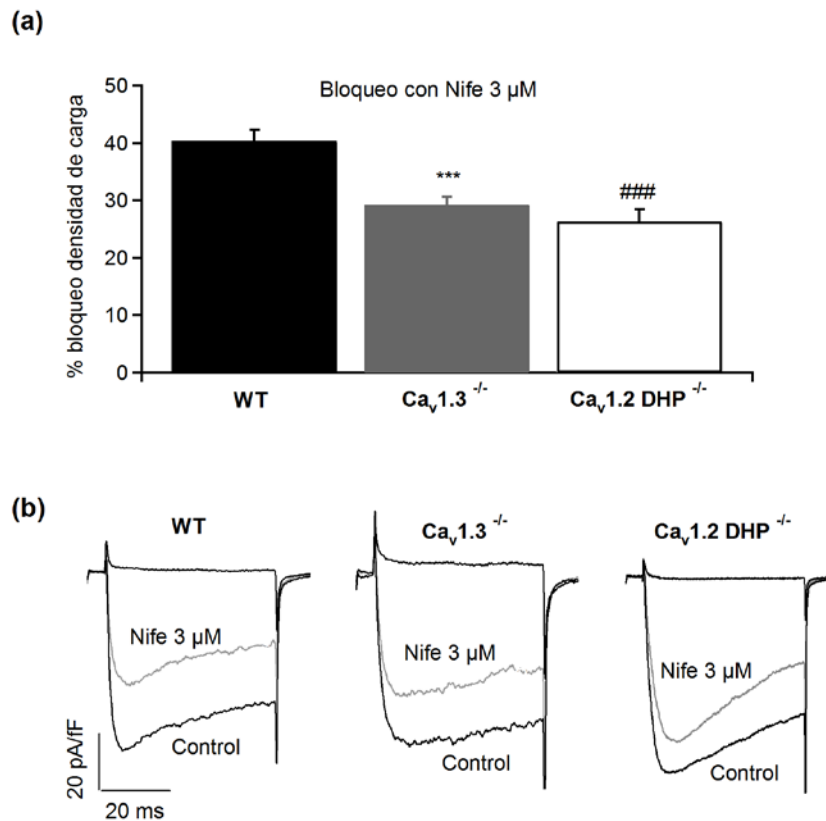


**Figura ratón 1. Caracterización inmunocitoquímica de los subtipos de canales  $Ca_v1$  expresados en las células cromafines de ratón.** Imágenes de microscopía confocal de células aisladas de ratones WT (a) y de ratones  $Ca_v1.3^{-/-}$  (b). Escala: 75 micras.

### **Sensibilidad a DHPs de los subtipos de canales $Ca_v1$**

Para investigar la naturaleza de los canales  $Ca_v1$ , empleamos la DHP nifedipino 3  $\mu$ M en las células cromafines de los ratones de las tres cepas de las que disponíamos (WT,  $Ca_v1.3^{-/-}$  y  $Ca_v1.2$  DHP<sup>-/-</sup>).

En primer lugar, se realizó un protocolo de rampa de voltaje para buscar el voltaje al que se obtenía la mayor corriente (0-10 mV). Luego se aplicaron pulsos cuadrados despolarizantes de 50 ms cada minuto, fijando el potencial ( $V_h$ ) a -80 mV. Nifedipino bloqueó la densidad de carga de la corriente de  $Ca^{2+}$  un  $40 \pm 2\%$  en las células WT (n=46) y un  $29 \pm 1.4\%$  (n=45) en las células  $Ca_v1.3^{-/-}$ , mostrando diferencias significativas respecto a las células WT (Figura ratón 2a y b). En consecuencia, al menos el 11% de la densidad de carga total de la corriente de  $Ca^{2+}$  al voltaje del pico de corriente se debe al canal  $Ca_v1.3$ . En las células de la cepa de ratón  $Ca_v1.2$ DHP<sup>-/-</sup>, la inhibición fue del  $26.4 \pm 2\%$  (n=18), resultado del bloqueo de los canales  $Ca_v1.3$  junto con la inhibición residual del canal  $Ca_v1.2$  mutado (Sinneger-Braun y col., 2004).



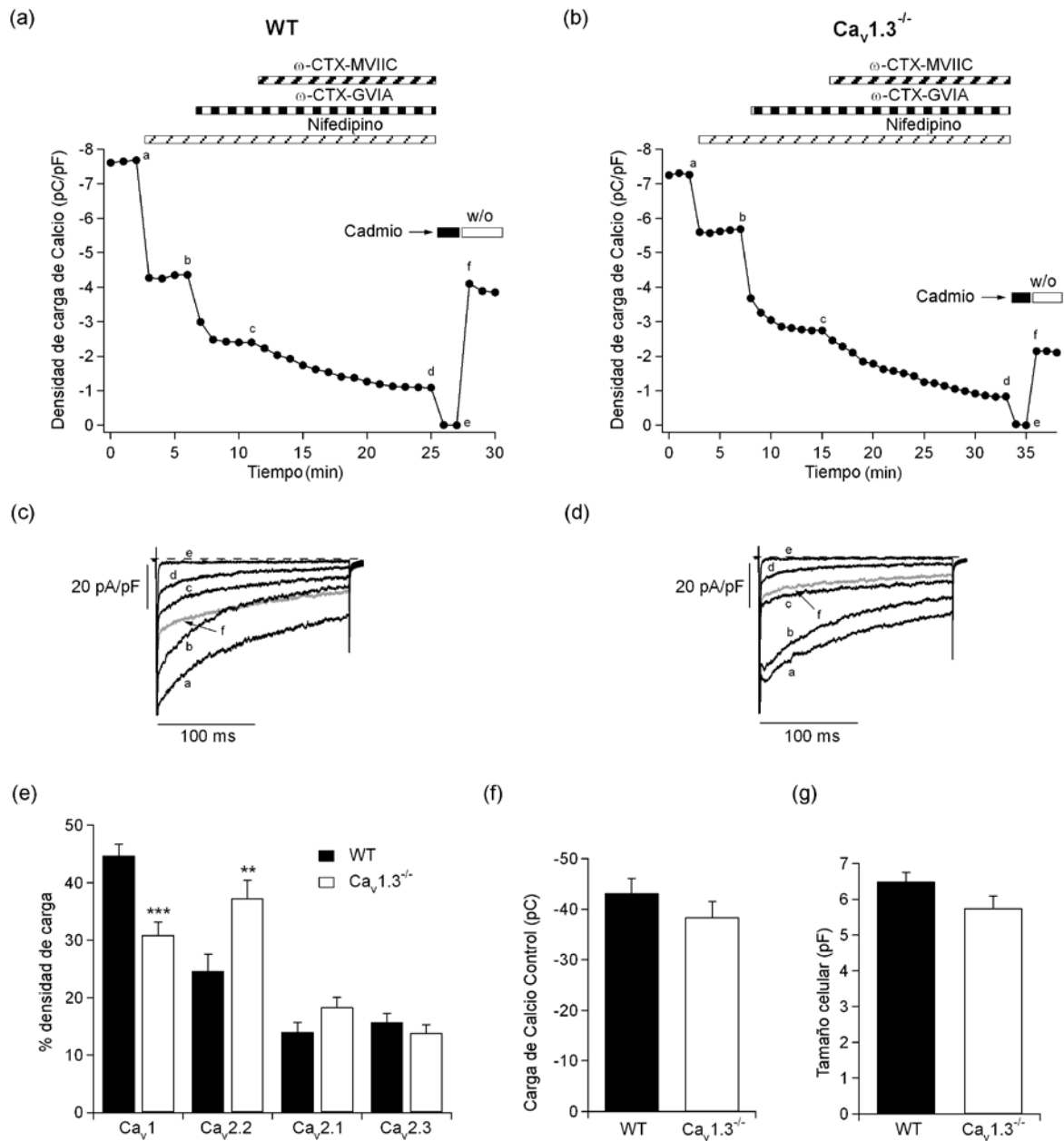
**Figura ratón 2. Subtipos de canales Ca<sub>v</sub>1 expresados en células cromafines de ratón.** Sensibilidad de los subtipos de canales Ca<sub>v</sub>1 a DHPs. **(a, c y e)** Bloqueo de la densidad de carga de la corriente de Ca<sup>2+</sup> obtenido tras la perfusión de nifedipino 3 μM en células WT, Ca<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup> y Ca<sub>v</sub>1.2DHP<sup>-/-</sup>. **(b, d y f)** Registros originales de la corriente de Ca<sup>2+</sup> en condiciones control o tras la perfusión de nifedipino 3 μM en células WT, Ca<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup> y Ca<sub>v</sub>1.2DHP<sup>-/-</sup>, respectivamente. Las barras representan la media ± SEM. \*\*\*p < 0.001, entre WT y Ca<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup>. ###p < 0.001, diferencias entre WT y Ca<sub>v</sub>1.2DHP<sup>-/-</sup>.

## 2. La supresión del canal del subtipo Ca<sub>v</sub>1.3 es compensada por el incremento de la expresión de los canales del subtipo Ca<sub>v</sub>2.2

Para estudiar si la supresión del canal Ca<sub>v</sub>1.3 en los ratones knock-out del tipo Ca<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup> era contrarrestada por un aumento de la expresión de otros tipos de canales, empleamos nifedipino 3 μM en las células de tipo WT y Ca<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup> después de que las corrientes control alcanzaran el estado estacionario. En la *Figura ratón 3* puede verse el curso temporal de un registro típico del bloqueo de densidad de carga ejercida por esta DHP en ratones WT.

Para ello aplicamos pulsos despolarizantes de 200 ms al voltaje del pico de corriente cada minuto. Después de 5 min de perfusión con nifedipino, se añadieron de manera secuencial y acumulativa otros bloqueantes de CCDV para abolir la corriente de los canales de tipo no- $\text{Ca}_v1$ : 1  $\mu\text{M}$  de  $\omega$ -CTX-GVIA se aplicó durante 5 min para bloquear canales de tipo  $\text{Ca}_v2.2$  y 3  $\mu\text{M}$  de  $\omega$ -CTX-MVIIC se añadió a los bloqueantes anteriores durante un mínimo de 12-14 minutos, para bloquear los canales  $\text{Ca}_v2.1$ . Por último, se aplicó 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  para abolir la corriente resistente al bloqueo por los otros bloqueantes. Pueden verse los registros originales de este experimento, y los diagramas de barras con las contribuciones de los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en los paneles *c* y *d* de la *Figura ratón 3*, respectivamente.

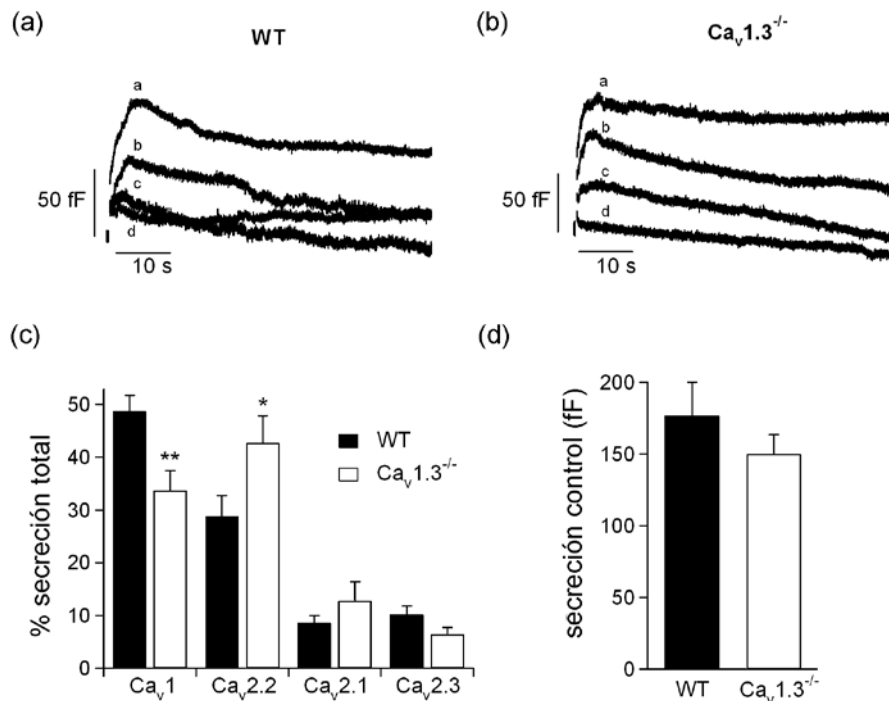
El mismo protocolo se llevó a cabo en las células cromafines de los ratones de la cepa  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$  (*Figura ratón 3b* y *d*). La contribución de los diferentes tipos de CCDV en estos ratones se muestra en los diagramas del panel 3e. Se observaron diferencias significativas entre las células de los ratones WT y de los  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$  en cuanto a la contribución de los canales  $\text{Ca}_v1$  y  $\text{Ca}_v2.2$ , lo que indicó que la ausencia de la subunidad  $\text{Ca}_v1.3\alpha1$  se compensaba por un aumento paralelo en la expresión de la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha1$ . Sin embargo, no se observó ningún cambio en la carga total (que fue de  $43.5\pm2.5$  pC en las células WT y de  $38\pm3$  pC en las células  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ ) (*Figura ratón 3f*), o en el tamaño entre ambos tipos celulares ( $6.5\pm0.3$  pF en WT y  $5.7\pm0.4$  pF en las  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ ) (*Figura ratón 3g*).



**Figura ratón 3. Disección farmacológica de los CCDV en las células cromafines de ratón de tipo WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ .** (a y b) Curso temporal de la densidad de carga de la corriente de  $Ca^{2+}$  obtenida tras la perfusión secuencial y la adición acumulativa de diferentes bloqueantes CCDV, en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente: nifedipino 3  $\mu$ M,  $\omega$ -CTX-GVIA 1  $\mu$ M,  $\omega$ -CTX-MVIIC 3  $\mu$ M, y  $Cd^{2+}$  200  $\mu$ M. (c y d) Registros originales de las corrientes de  $Ca^{2+}$  registrados utilizando cada bloqueante (correspondientes a los puntos a-f en los paneles 3a y b, donde a: control, b: tras la perfusión de nifedipino, c: tras nifedipino más  $\omega$ -CTX-GVIA y d: tras nifedipino más  $\omega$ -CTX-GVIA y  $\omega$ -CTX-MVIIC. (e) Densidad de carga de  $Ca^{2+}$  de los diferentes tipos de canales para células WT (columnas negras) y células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (columnas blancas), respectivamente. (f) Carga de la corriente de  $Ca^{2+}$  total obtenida bajo condiciones control para las células WT (columna negra) y  $Ca_v1.3^{-/-}$  (columna blanca). (g) Tamaños de las células cromafines obtenidas de ratones WT

(columna negra) y  $Ca_v1.3^{-/-}$  (columna blanca). Las barras representan la media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , frente al porcentaje del mismo canal en la otra cepa de ratón.

Gracias al empleo de la técnica de “patch-clamp”, pudimos registrar de manera simultánea a la corriente la capacidad de membrana ( $C_m$ ), que nos permitió conocer indirectamente la exocitosis de vesículas en estas células. Así, los registros de  $C_m$  en la *Figura ratón 4a* y *b* se lograron en las mismas células de la *Figura ratón 3a* y *b*. El porcentaje de contribución total a la secreción de los tipos de canales en las células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$  se muestra en la *Figura ratón 4c*. Observamos que la reducción de la contribución de canales  $Ca_v1$  al proceso de secreción iba en paralelo con la mayor participación de los canales de tipo  $Ca_v2.2$ . Como resultado, la secreción total evocada por los pulsos despolarizantes de 200 ms no se vió modificada ( $179 \pm 30$  fF y  $148 \pm 15$  fF en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente) (*Figura ratón 4d*).

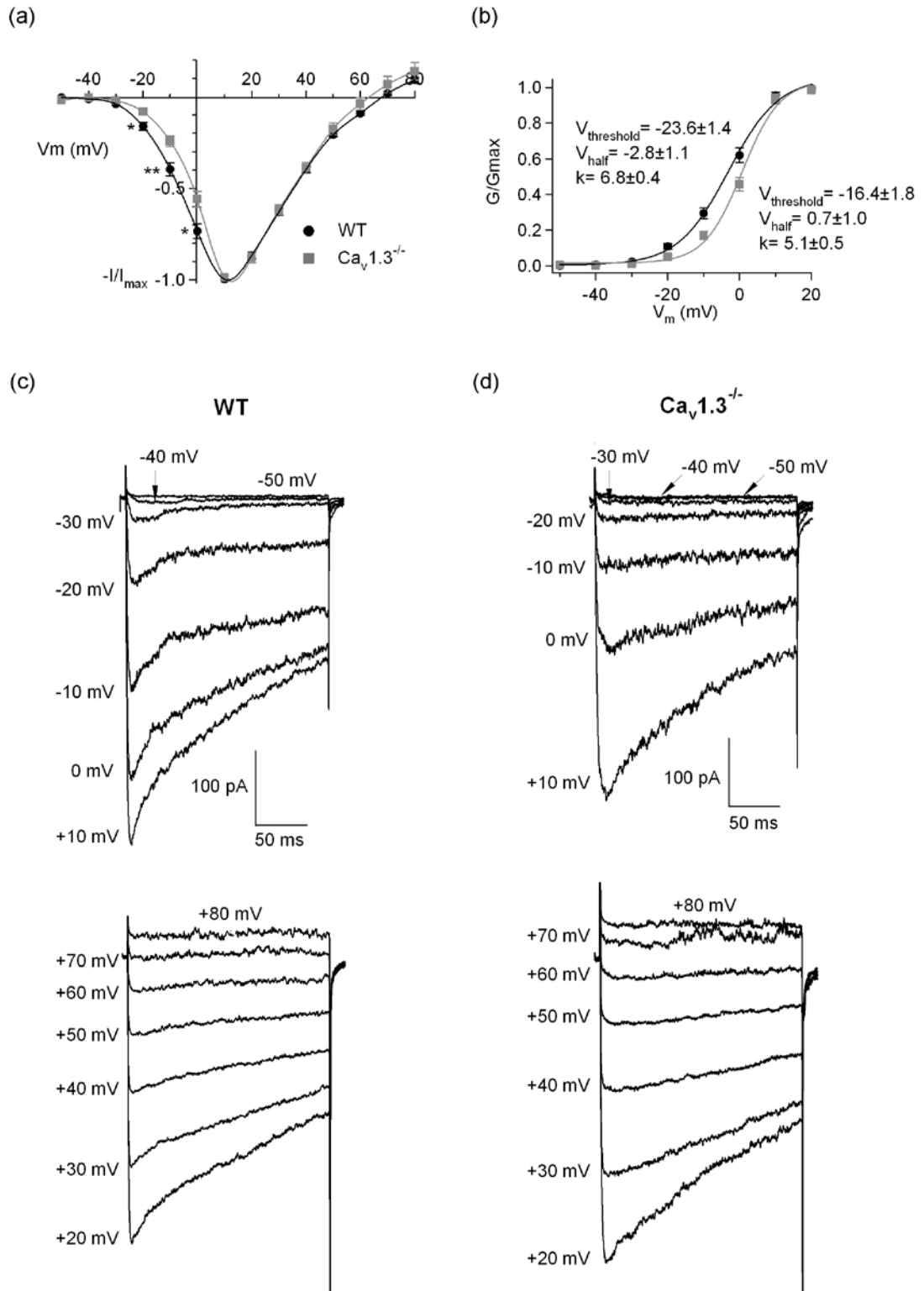


**Figura ratón 4. Contribución de los CCDV a la exocitosis de neurotransmisores en células cromafines de ratones de tipo WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ .** (a y b) Registros de  $C_m$  obtenidos de forma simultánea a las corrientes de  $Ca^{2+}$  de la *Figura ratón 2* (c y d) en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente. (c) Porcentaje de secreción total atribuida a cada tipo de CCDV en las células WT (columnas negras) y en las  $Ca_v1.3^{-/-}$  (columnas blancas). (d) Secreción total alcanzada en condiciones control en células WT (columnas negras) y  $Ca_v1.3^{-/-}$  (columnas blancas),

respectivamente. Los diagramas de barras representan la media  $\pm$  SEM. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, respecto al porcentaje del mismo canal en la otra cepa de ratón.

### **3. Los canales $Ca_v1.3$ se activan a potenciales de membrana más negativos que los canales $Ca_v1.2$**

Se realizaron curvas de corriente de  $Ca^{2+}$  respecto a voltaje (curvas I-V) mediante la aplicación cada minuto de pulsos despolarizantes de 200 ms a potenciales crecientes de 10 en 10 mV, desde -50 mV a +80 mV ( $V_h = -80$  mV). La *Figura ratón 5a* muestra las curvas I-V para las células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$  obtenidas en condiciones control. Se obtuvo una clara desviación hacia la derecha de la curva de las células de  $Ca_v1.3^{-/-}$  con respecto a la curva de las del tipo WT (existiendo diferencias significativas entre el pico de la corriente de  $Ca^{2+}$  a -20 mV, -10 mV y 0 mV entre ambos tipos celulares). El ajuste de ambas curvas I-V a la función de Boltzmann (*ecuación 1*, apartado de "materiales y métodos") dio valores de  $V_{threshold}$ ,  $V_{half}$  y  $k$  que diferían significativamente entre las células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$  (*Figura ratón 5b*). En los paneles *c* y *d* de la *Figura ratón 5* pueden verse los registros originales de estas corrientes.



**Figura ratón 5. Activación dependiente de voltaje de los CCDV. (a)** Curvas I-V obtenidas en condiciones control en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$  (n=8-12). Los datos se normalizaron como el porcentaje de corriente en condiciones control a 10 mV, expresados como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . **(b)** Media y superimposición de los ajustes de la curva de Boltzmann obtenidos de las I-V del panel a para cada tipo celular. **(c y d)** Registros originales de las corrientes de  $Ca^{2+}$  obtenidas en condiciones control para WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente, a diferentes voltajes.

#### 4. Los canales $Ca_v1.2$ se inactivan más rápido que los canales $Ca_v1.3$

Para examinar posibles diferencias en los procesos de inactivación, se aplicaron pulsos largos de 1s de duración. La inactivación se determinó como la corriente de  $Ca^{2+}$  que quedaba al final del pulso, expresada como un porcentaje de la corriente máxima ( $I_{1000}/I_{peak}$ ) (*Figura ratón 6a*, panel de la izquierda). Los valores fueron de  $29\pm 3\%$  y  $27\pm 4\%$  en células WT ( $n=14$ ) y  $Ca_v1.3^{-/-}$  ( $n=13$ , sin existir diferencias significativas), indicando que la inactivación fue incompleta (alrededor del 70%) al final de un pulso de despolarizantes 1s.

El curso temporal de la inactivación durante el pulso despolarizante de 1s fue mono- o biexponencial. En pocas células WT se observó inactivación biexponencial (7% de células, 1 célula de 14), pero sí era frecuente en las células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (5 de 13) (*Figura ratón 6a*, panel central). Las constantes de tiempo de inactivación obtenidas con el ajuste monoexponencial ( $\tau_{inact}$  simple) eran idénticas en ambos tipos celulares. Las constantes de tiempo de inactivación calculadas con un ajuste biexponencial ( $\tau_{inact}$  doble), que comprende un componente lento ( $\tau_{inact}$  lenta) y uno rápido ( $\tau_{inact}$  rápida) no variaban significativamente entre las células WT y las  $Ca_v1.3^{-/-}$  (*Figura ratón 6a*, panel derecho) (*tabla 1*). Así, la mayoría de las corrientes  $Ca_v1$  en las células WT exhibían una inactivación monoexponencial, mientras que las corrientes en una subpoblación de canales  $Ca_v1$  en las células  $Ca_v1.3^{-/-}$  se ajustaron a una curva de inactivación biexponencial, revelando un componente rápido de inactivación.



Tabla 1. Cinéticas de inactivación de las corrientes  $Ca_v1$  en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ .

	$I_{1000}/I_{pico}$ (%)	$\tau_{inact}$ simple (% cels)	$\tau_{inact}$ simple (ms)	$\tau_{inact}$ doble (% cels)	$\tau_{inact}$ rápida (ms)	$\tau_{inact}$ lenta (ms)	Contribución (%)		Nº cels
							$\tau_{inact}$ rápida	$\tau_{inact}$ lenta	
WT	29±3	93	513±78	7	10	385	45.5	54.4	14
$Ca_v1.3^{-/-}$	27±4	61.5	575±125	38.5	35±8	407±96	42±9	58±9	13

Los parámetros calculados para ambas cepas de ratón fueron:  $I_{1000}/I_{pico}$ : corriente de  $Ca^{2+}$  que queda al final del pulso expresada como porcentaje de la corriente al pico;  $\tau_{inact}$  simple: constante de tiempo de inactivación, obtenida mediante el ajuste a una función exponencial simple;  $\tau_{inact}$  doble: constante de tiempo de inactivación, calculada mediante el ajuste a una función exponencial doble;  $\tau_{inact}$  rápida: constante de tiempo de inactivación del componente rápido, obtenida mediante el ajuste a la función exponencial doble;  $\tau_{inact}$  lenta: constante de tiempo de inactivación del componente lento, obtenida mediante el ajuste a la función exponencial doble.

Para poder realizar una buena comparación, en la *Figura ratón 6b*, las corrientes  $Ca_v1$  medias calculadas para WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$  se superpusieron y escalaron al pico de la corriente  $Ca_v1$  en las células WT. Aquí, la corriente  $Ca_v1$  de las células WT se ajustó a una curva monoexponencial ( $\tau_{inact}=233$  ms), mientras que la corriente de  $Ca_v1.3^{-/-}$  se ajustó a una función biexponencial ( $\tau_{inact}$  rápida=8.8 ms;  $\tau_{inact}$  lenta=416 ms). Así, en promedio, los canales  $Ca_v1.2$  se inactivan más rápido que los canales  $Ca_v1.3$ .

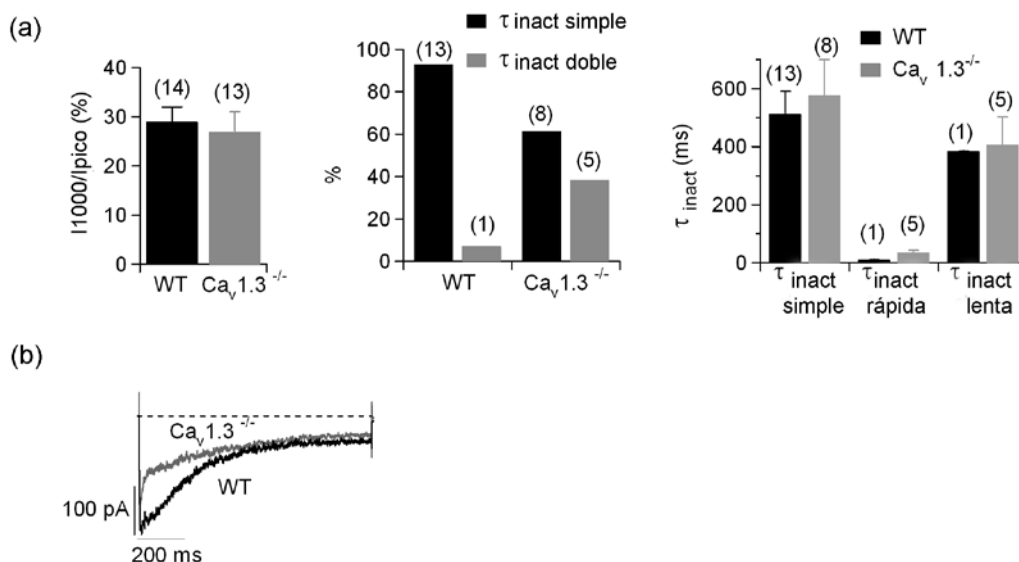


Figura ratón 6. Cinéticas de los subtipos de canales  $Ca_v1$ . (a) Izquierda, corriente de  $Ca^{2+}$  que queda al final del pulso expresada como porcentaje de la corriente al pico ( $I_{1000}/I_{peak}$ ) en células WT (columna negra) y en células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (columna gris); en la parte central, porcentaje de células cuya cinética de inactivación puede ajustarse a una función exponencial simple (columnas negras)

o doble (columnas grises) en ambos tipos celulares; a la derecha, tau media de inactivación simple alcanzada en el ajuste exponencial, y tau de inactivación doble, la cual exhibe dos componentes, uno rápido y uno lento, para WT y para  $Ca_v1.3^{-/-}$  (columnas negras y grises, respectivamente). **(b)** Registros medios de las corrientes  $Ca_v1$  de WT y de  $Ca_v1.3^{-/-}$ , superpuestas y escaladas al pico de la corriente de WT. El número de células aparece entre parentesis.

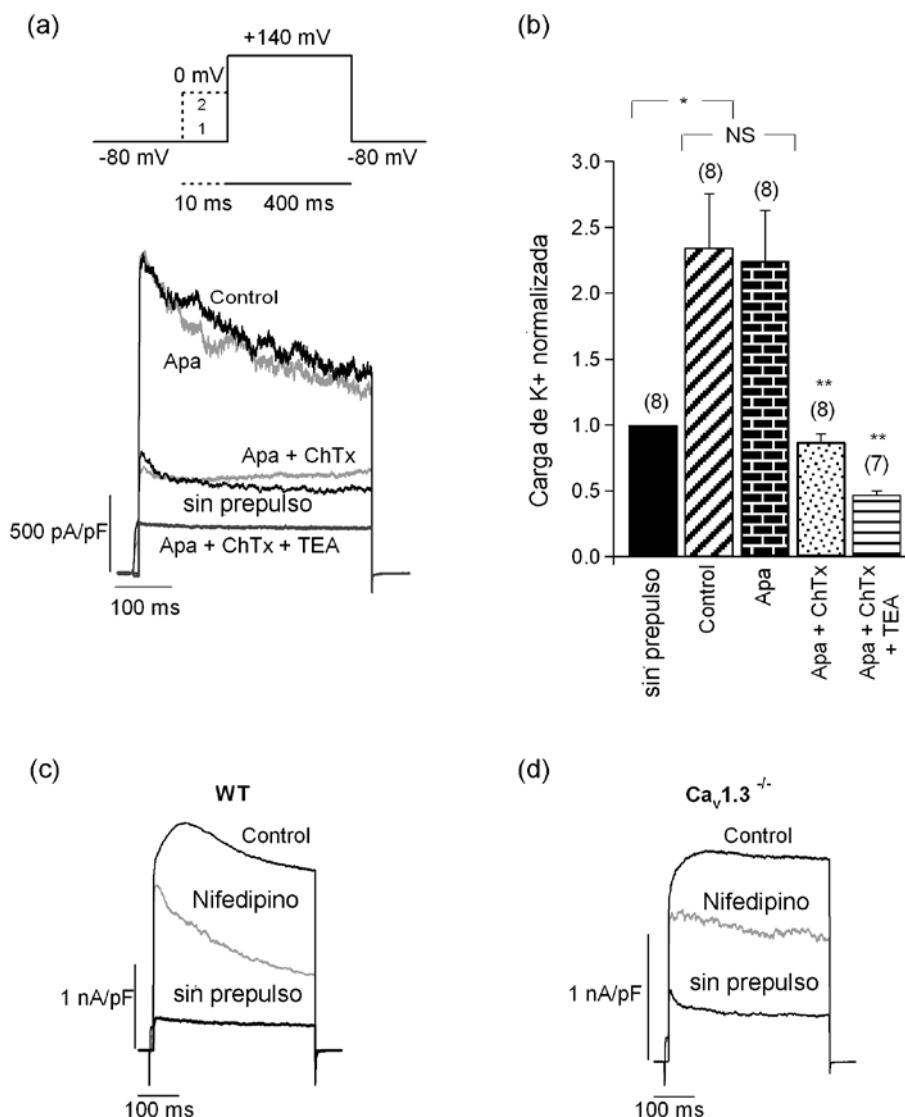
## **5. Los subtipos de canal $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ funcionalmente están acoplados a los canales BK**

Prakriya y Lingle fueron los primeros en determinar en células cromafines de rata el acoplamiento entre los canales  $Ca_v1$  y los canales BK (Prakriya y Lingle, 1999). Nosotros estábamos interesados en determinar la contribución de los diferentes subtipos de canal  $Ca_v1$  a la excitabilidad de la célula por medio del estudio del acoplamiento de los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  a los canales BK. Para ello, empleamos un protocolo para reclutar los canales BK. Éste consistía en la aplicación de prepulsos cortos de 10 ms a 0 mV antes del pulso test ( $V_t$ ) de 400 ms a 140 mV o 180 mV; a estos potenciales, la entrada de  $Ca^{2+}$  no ocurre durante el pulso. Para comprobar esto y corroborar que el  $Ca^{2+}$  entraba exclusivamente durante el prepulso, se aplicaba un pulso que no iba precedido por el prepulso, y que por tanto no debía evocar ninguna secreción (reflejada en la medición simultánea de  $C_m$ , datos que no se muestran) (*Figura ratón 7a*, parte superior).

La potenciación de la densidad de carga de la corriente de  $K^+$  evocada por el prepulso era idéntica en ambas cepas de ratones y ascendió al  $268.7 \pm 25\%$  y  $250 \pm 20\%$  en las células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente. Las corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  activadas mediante este protocolo eran de tipo BK, como lo demuestra su insensibilidad a apamina 200 nM (Apa, bloqueo de  $1.55 \pm 1\%$  en 5 células, sólo el 11% en 1 célula) y su posterior inhibición por charibdotoxina 100 nM (ChTx, inhibición completa en 6 de 6 células), que devuelve la corriente al mismo nivel que el que existía sin el prepulso. La posterior perfusión con TEA (45 mM) causó un bloqueo de la densidad de carga de  $K^+$  total de un  $82 \pm 2.5\%$  ( $n=6$ ). Las corrientes BK representaban el  $60.5 \pm 3.9\%$  ( $n=16$ ) de la corriente de  $K^+$  total y el  $80 \pm 2\%$  ( $n=5$ ) de la corriente sensible a TEA. Los registros originales de las corrientes en cada condición de una célula representativa se muestran en la parte

inferior de la *Figura ratón 7a*. En el panel *7b* aparecen los gráficos de barras de la densidad de carga de las corrientes de K<sup>+</sup> media y normalizada con respecto a la corriente en ausencia de un prepulso.

Se estudió el efecto de nifedipino 3 μM sobre los canales BK reclutados mediante el protocolo antes mencionado. En la *Figura ratón 7c* y *d* se muestran registros típicos de la acción de esta DHP en las células WT y Ca<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup>, respectivamente. En las células WT, la DHP bloqueaba los canales BK un 52.7±7%, mientras que en las células Ca<sub>v</sub>1.3<sup>-/-</sup> estos se bloquearon un 35±4.6%. Estos datos indican que, aunque ambos subtipos de canal están acoplados a los canales de BK, la contribución de los canales Ca<sub>v</sub>1.2 en el reclutamiento de los canales BK es mayor que la del subtipo de canal Ca<sub>v</sub>1.3.



**Figura ratón 7. Acoplamiento de los subtipos de canales  $Ca_v1$  a los canales BK.** (a) Sección superior: protocolo de doble pulso empleado para el reclutamiento de los canales BK. Este incluye un pulso test de 400 ms ( $V_t$ ) a 140 mV o potencial superior (trazo 1), seguido de un prepulso de 10 ms aplicado a 0 mV antes de  $V_t$  (trazo 2). Sección inferior: registros de corriente de  $K^+$  original obtenida empleando este protocolo en condiciones control y tras la perfusión de diferentes bloqueantes de canales de  $K^+$ , añadidos de forma secuencial y acumulativa. (b) La densidad de carga de la corriente de  $K^+$  media se normalizó para cada condición con respecto a la corriente en ausencia de prepulso. El número de células aparece entre paréntesis. (c-d) Efecto de 3  $\mu$ M de nifedipino sobre las corrientes BK en las células WT (c) y  $Ca_v1.3^{-/-}$  (d).

## 6. Los canales $Ca_v1.2$ controlan el disparo de los PAs

Se ha descrito que los PAs evocados por ACh en las células cromafines son dependientes de  $Na^+$  (Biales y col., 1976) y de  $Ca^{2+}$  (Brandt y col., 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980; Kidokoro y col., 1982).

A los canales  $Ca_v1$  se les ha asignado el papel de disparar PAs espontáneos en células cromafines de ratón, contribuyendo así a la corriente marcapasos de entrada que subyace al PA (Marcantoni y col., 2009). El disparo de PAs espontáneos provocaría la liberación basal de neurotransmisores (Zhou y Mislser, 1995). Por tanto, nosotros investigamos la posible contribución de los subtipos  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  al disparo o a la forma de los PAs, midiendo, en la configuración de fijación de corriente (CC) de la técnica de "patch-clamp", los efectos de nifedipino en el disparo espontáneo de PAs en las células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ .

Observamos disparo de PAs espontáneo en el 62% de las células WT (13 de las 21 células probadas), y en el 59% de las células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (10 de las 17 células probadas). Estas células mostraron grandes corrientes de  $Na^+$  (pico de corriente al inicio de la rampa:  $596 \pm 207$  pA en células WT y  $662 \pm 204$  pA en células  $Ca_v1.3^{-/-}$ , mientras que las células sin actividad espontánea mostraron pequeñas corrientes de  $Na^+$  ( $23 \pm 8$  pA en células WT y  $41.7 \pm 11$  pA en las  $Ca_v1.3^{-/-}$ ). La frecuencia de disparo de los PAs fue de  $3.9 \pm 0.7$  Hz y  $2.5 \pm 0.7$  Hz para WT (n=13) y  $Ca_v1.3^{-/-}$  (n=10), respectivamente, no existiendo diferencias significativas.

Esto nos indica que no hay una contribución relevante de los canales  $Ca_v1.3$  al disparo de los PAs.

Se analizaron diferentes parámetros de los PAs en ambos tipos celulares antes y después de la perfusión de la DHP (*Figura ratón 8a y b*): la velocidad de despolarización, el potencial máximo, el potencial mínimo, la altura, la anchura a media altura, y la cadencia de disparo (*Tabla 2*). Inicialmente se probó nifedipino a una concentración de 300 nM y luego una concentración de 3  $\mu$ M para inhibir totalmente los canales  $Ca_v1.2$  y la mayoría de los canales  $Ca_v1.3$  en células WT. Se obtuvieron los PAs medios haciendo el promedio de los PAs registrados durante 10 s en 6 células WT y en 4 células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (*Figura ratón 8c y d*). En las células WT y en las  $Ca_v1.3^{-/-}$ , ambas concentraciones de nifedipino produjeron cambios en la forma y frecuencia de disparo de los PAs: aumentaron significativamente el ancho a media altura, pero disminuyeron la frecuencia de disparo, la velocidad de despolarización y el potencial mínimo. Estos cambios fueron idénticos en ambas cepas de ratones y podrían explicarse por el bloqueo de canal BK con posterioridad a la inhibición de los canales del subtipo  $Ca_v1.2$  (ver en el apartado de "discusión").

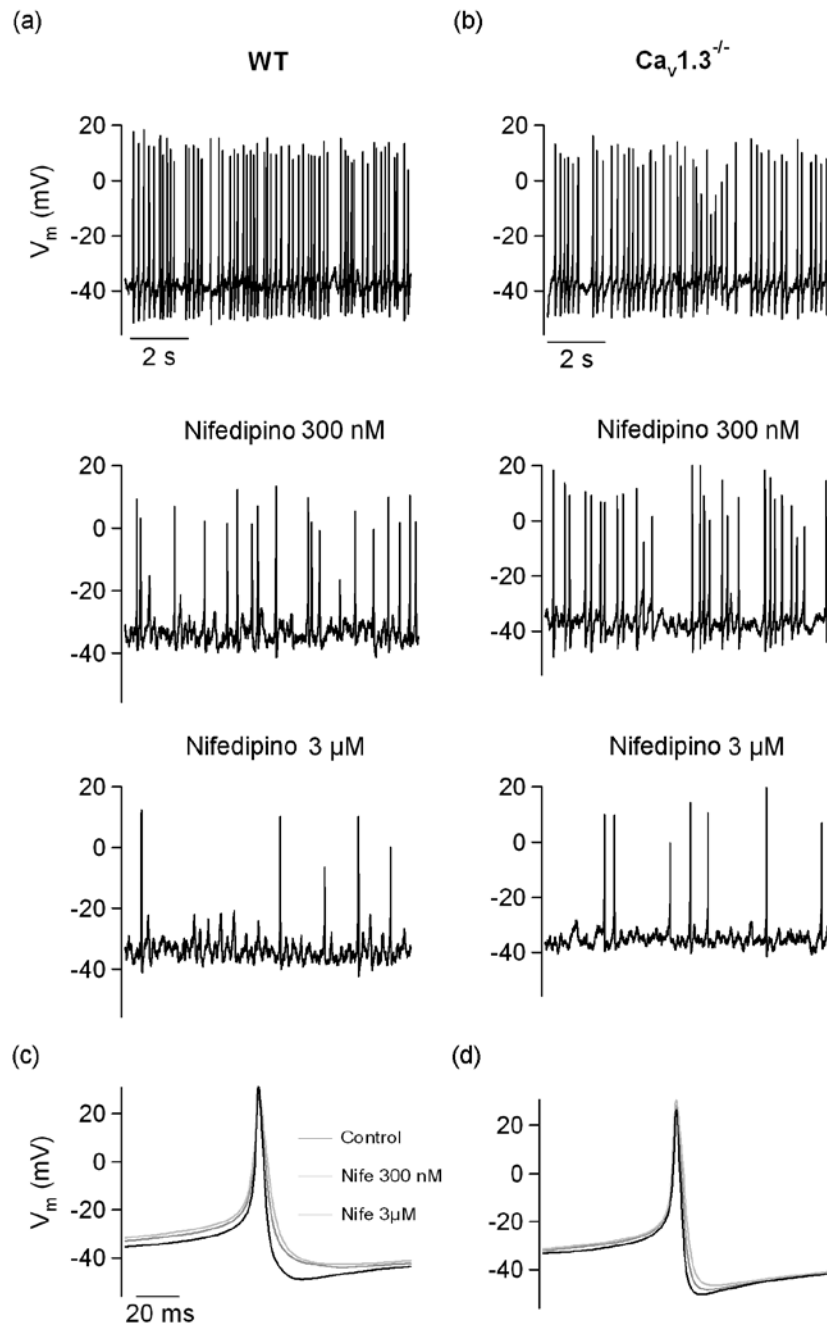
**Tabla 2. Parámetros cinéticos de los PAs espontáneos obtenidos en condiciones control y en presencia de nifedipino en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ .**

	Depol. rate (V/s)	Overshoot (mV)	HH Width (ms)	Height (mV)	Undershoot (mV)	Repol. rate (V/s)	Firing rate (Hz)
WT (n = 6)							
Control	50.7 ± 10.9	31.0 ± 5.69	3.7 ± 0.7	81.4 ± 5.8	-50.5 ± 2.9	-29.1 ± 4.4	4.9 ± 0.9
Nife 300 nM	38.6 ± 11.2	31.0 ± 4.0	5.4 ± 1.2*	72.9 ± 8.2	-45.7 ± 3.8*	-18.9 ± 4.5*	3.1 ± 0.8
Nife 3 $\mu$ M	39.2 ± 13.2	29.4 ± 5.0	5.8 ± 1.2*	73.2 ± 7.4	-43.8 ± 3.7***	-15.9 ± 3.9*	1.6 ± 0.5**
$Ca_v1.3^{-/-}$ (n = 4)							
Control	46.6 ± 18.7	26.3 ± 7.9	3.3 ± 0.5	76.6 ± 10.5	-50.4 ± 3.6	-33.0 ± 5.5	4.5 ± 1.0
Nife 300 nM	40.3 ± 12.4	28.2 ± 6.6	3.8 ± 0.6*	76.5 ± 9.0	-48.3 ± 3.8***	-26.5 ± 5.7#	3.1 ± 0.8*
Nife 3 $\mu$ M	36.7 ± 8.2	29.0 ± 5.3	4.2 ± 0.5*	75.2 ± 7.6	-46.2 ± 3.9*	-20.6 ± 40.2***	1.2 ± 0.6*

Una espiga se consideraba PA cuando el pico era superior a 10 mV.  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ; # $p < 0.001$ . No existen diferencias significativas entre las células WT y las  $Ca_v1.3^{-/-}$ . Depol. rate: velocidad máxima de despolarización; Overshoot: potencial máximo; HH Width: anchura a media altura; Height: altura total; Undershoot: potencial mínimo; Repol.rate: velocidad máxima de repolarización; Firing rate: frecuencia de disparo.

Estos datos también sugieren que el bloqueo ejercido por nifedipino 300

nM en los canales  $Ca_v1.2$  es incompleto a  $-40$  mV (potencial interespigas). Así, la mayor frecuencia de disparo en las células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$  en presencia de nifedipino 300 nM con respecto a lo observado en la presencia de nifedipino 3  $\mu$ M, indica ese bloqueo parcial y completo de canales  $Ca_v1.2$ , respectivamente, y por consiguiente de los canales BK, que se produce en ambas condiciones.



**Figura ratón 8. Contribución de los subtipos de canales Cav1 a la actividad marcapasos, y a la forma de los PA. (a-b)** Registros de PAs espontáneos en células WT (a) o  $Ca_v1.3^{-/-}$  (b) bajo condiciones control, y tras la perfusión de nifedipino 300 nM y 3  $\mu$ M. **(c-d)** PA medio obtenido a

partir de los PAs registrados durante 10 s en condiciones control o tras la perfusión de nifedipino 300 nM y 3  $\mu$ M en células WT (n=6) (c) o  $Ca_v1.3^{-/-}$  (n=4) (d).

El número idéntico de células que muestran PAs espontáneos y la frecuencia de disparo similar en las células WT en comparación con las  $Ca_v1.3^{-/-}$  es suficiente argumento en contra de la existencia de un papel importante de los canales  $Ca_v1.3$  en el disparo de los PAs. Sin embargo, para investigar más sobre este tema, se realizaron experimentos adicionales. En primer lugar, se abordó la contribución de los subtipos de canal  $Ca_v1$  a la corriente de entrada anterior al PA. Construimos un diagrama ya utilizado por otros grupos conocido como “**phase-plane plot**” (Jenerick, 1963), que sirve para identificar el potencial umbral de disparo en cada cepa de ratón (*Figura ratón 9a y b*). Los estímulos de voltaje aplicados fueron los PAs medios obtenidos en la *Figura ratón 8c y d* en condiciones control para ambos tipos celulares. El potencial umbral (marcado por las flechas) se calculó como el voltaje en que la  $dV/dt$  incrementaba desde la línea basal inicial. Los umbrales de disparo obtenidos fueron -27 mV y -22 mV para WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente.

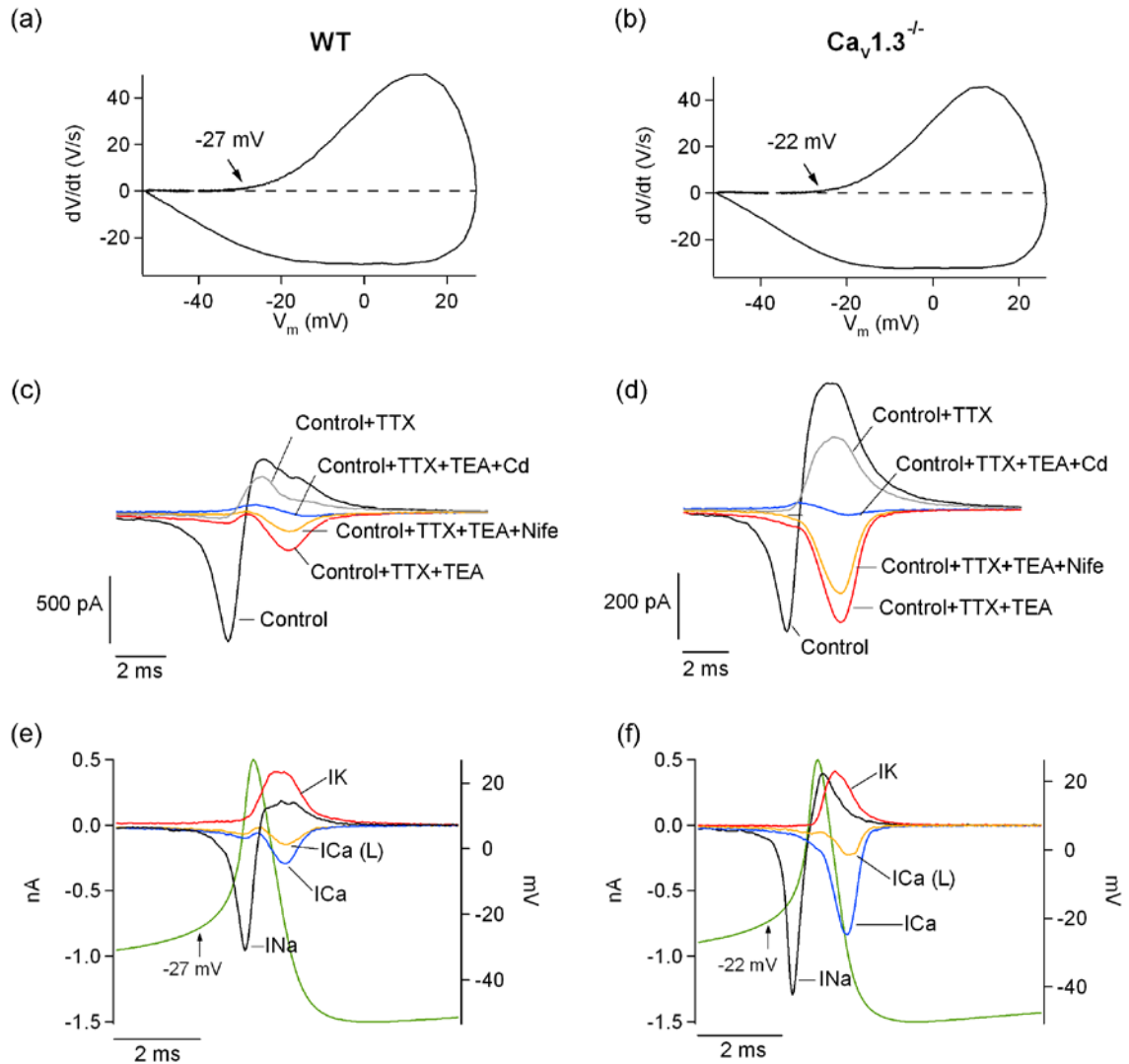
Para esclarecer la contribución de los subtipos de canal  $Ca_v1$  a la corriente marcapasos, estudiamos los componentes iónicos de la corriente que fluye antes de que se alcance el potencial umbral en los experimentos de “action potential clamp” (AP-clamp), en los que el estímulo aplicado a la célula es el PA modelo generado como se explicó anteriormente. Bloqueantes de canales de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  se añadieron de manera secuencial y acumulativa para estudiar la contribución de las diferentes conductancias iónicas al PA. Así, las células se perfundieron inicialmente con una solución control (que en materiales y métodos denominé también como Tyrode), luego se añadió TTX 2  $\mu$ M para bloquear los canales de  $Na^+$  (control+TTX), seguida de una solución con TEA 45 mM para bloquear los canales de  $K^+$  (control+TTX+TEA). A continuación, se incluyó nifedipino 3  $\mu$ M a la solución de perfusión (control+TTX+TEA+nife) y finalmente,  $CdCl_2$  200  $\mu$ M (control+TTX+TEA+nife+Cd) (*Figura ratón 9c y d*). De estos registros se calcularon las corrientes de cada tipo, que aparecen representadas en la *Figura ratón 9e y f*. Para obtener la corriente de  $Na^+$ , la corriente obtenida con la “control+TTX” se sustrajo de la corriente obtenida únicamente con la

“control”. La corriente de  $K^+$  se calculó como la diferencia entre “Solución 3+TTX+TEA” menos “control+TTX”. La corriente  $Ca_v1$  se obtuvo como la diferencia entre “control+TTX+TEA” y “control+TTX +TEA+Nife’ y la corriente total de  $Ca^{2+}$  como la diferencia entre “control+TTX+TEA” y “control+TTX+TEA+Cd’.

Las células se agruparon en dos grupos según la contribución del canal  $Ca_v1$  en el punto del potencial umbral calculado para cada tipo celular, poniendo como límite 10 pA de corriente de tipo  $Ca_v1$ . En un grupo de células (en el que la corriente  $Ca_v1$  al potencial umbral era menor de 10 pA), las contribuciones del canal  $Ca_v1$  a la corriente de  $Ca^{2+}$  fueron de  $-1.9 \pm 1.2$  pA ( $n=13$ ) y  $-1.6 \pm 1.6$  pA ( $n=13$ ) en el umbral en WT y en  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente (datos no mostrados). Las corrientes totales de  $Ca^{2+}$  ascendieron a  $-4.2 \pm 1.9$  pA ( $n=12$ ) y  $-4.1 \pm 1.5$  pA ( $n=13$ ), respectivamente. Por lo tanto, es probable que en este grupo los canales  $Ca_v1$  no contribuyan a los PAs, ya que si calculamos la corriente inyectada debida a estos canales (Rin), los incrementos de potencial serían de 0.4 a 4.4 mV en WT y de 0.41 a 1.88 mV en las células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (tomando como Rin  $4 \pm 0$  G $\Omega$  y  $4.1 \pm 0.3$  G $\Omega$ , en WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente).

En el otro grupo de células (en el que la corriente  $Ca_v1$  al potencial umbral era mayor de 10 pA) las contribuciones de los canales  $Ca_v1$  a la corriente de  $Ca^{2+}$  era de  $-36.1 \pm 6.7$  pA ( $n=10$ ) y de  $-19 \pm 3.2$  pA ( $n=12$ ) al potencial umbral, para WT y para  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente, existiendo diferencias significativas entre ambos tipos celulares ( $p < 0.05$ ) (*Figura ratón 9c-f*). La corriente total de  $Ca^{2+}$  era  $-44.5 \pm 9$  pA ( $n=10$ ) para las células WT y  $-29.7 \pm 3.9$  pA ( $n=12$ ) para las  $Ca_v1.3^{-/-}$ , no mostrando diferencias significativas. Esto significa que las contribuciones de los canales del subtipo  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  a la corriente total de  $Ca^{2+}$  al potencial umbral eran 64% y 17%, respectivamente. Así, en casi la mitad de células, los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  contribuyen a la corriente de entrada que precede al potencial umbral, con una mayor participación de los canales  $Ca_v1.2$  que de los  $Ca_v1.3$ .

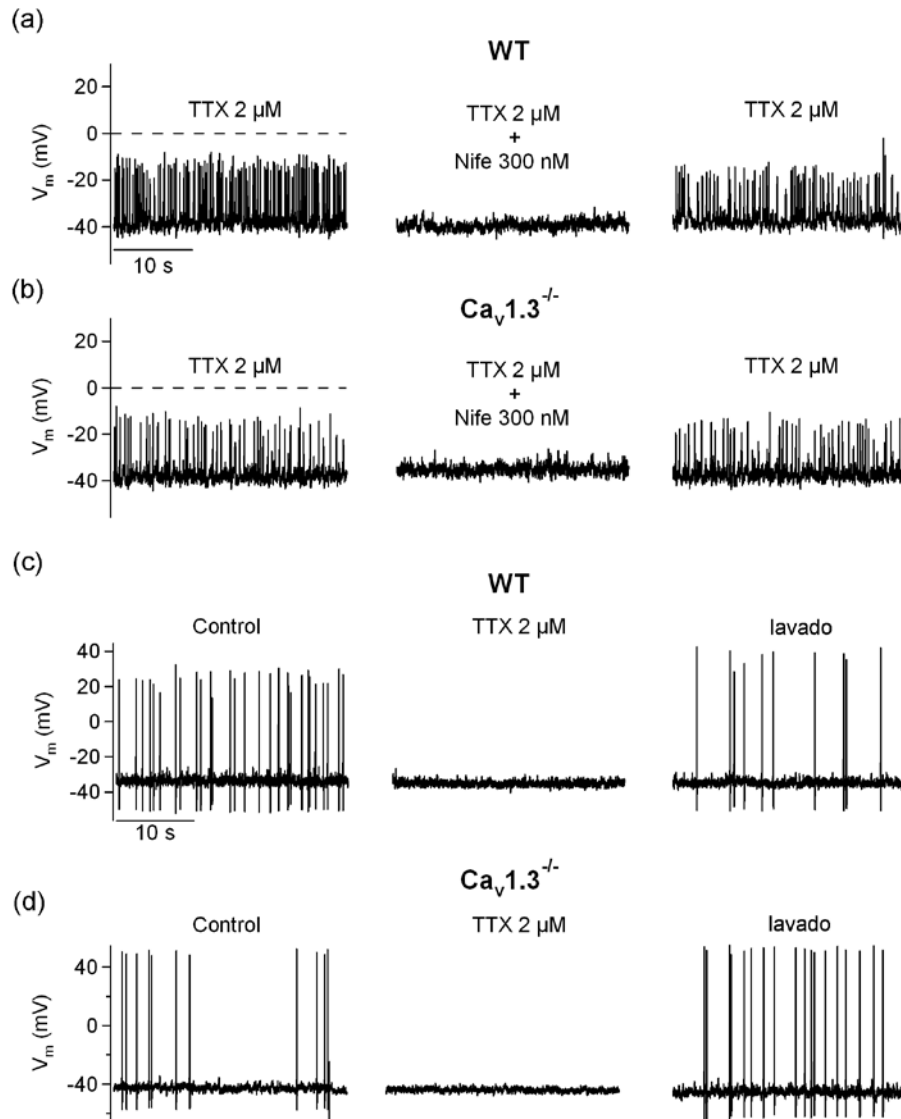




**Figura ratón 9. Contribución de los subtipos de canales  $Ca_v1$  a la actividad marcapasos.** (a-b) "Phase-plane plot" obtenido al representar  $dV/dt$  frente al voltaje del estímulo. Las flechas indican el voltaje umbral en cada tipo celular (-27 mV y -22 mV para WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente). (c-d) experimentos de "AP-clamp" llevados a cabo al aplicar el estímulo obtenido en condiciones control en la *Figura ratón 8* (g y h) cada 30 s. (e-f) Corrientes iónicas calculadas a partir de los registros originales de los paneles c y d, para las células WT y las  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente. El estímulo aplicado, obtenido de la *Figura ratón 8* (g y h), en condiciones control, aparece superpuesto a las corrientes iónicas.

Para obtener una confirmación adicional de que los canales  $Ca_v1.2$  contribuían más al disparo de los PAs, realizamos un segundo grupo de experimentos, donde, en presencia de TTX 2  $\mu$ M, se observaba actividad espontánea oscilatoria, incluso en las células del tipo  $Ca_v1.3^{-/-}$ . Esta actividad se abolía completamente tras la perfusión de nifedipino 300 nM (en 4 de 8 células

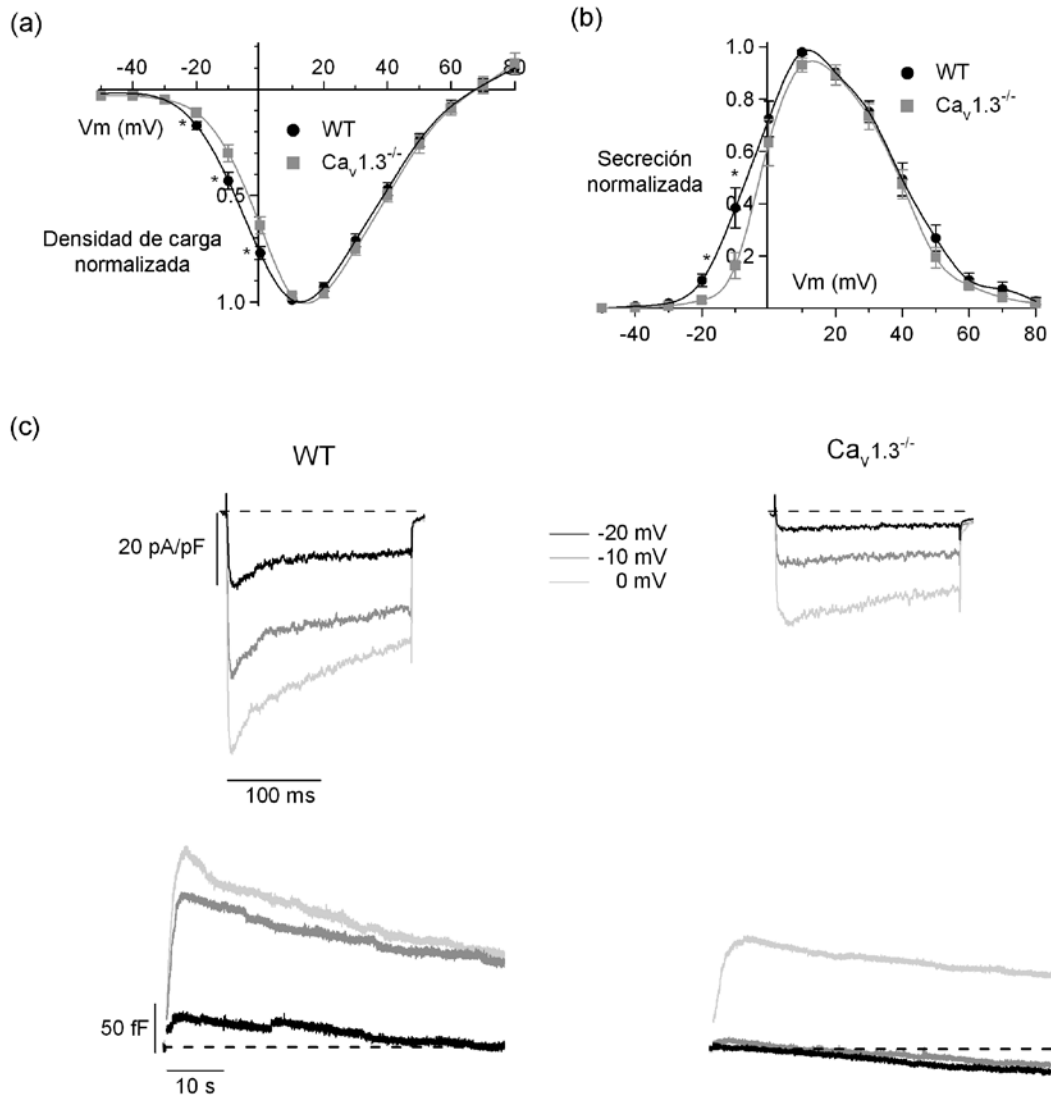
WT y en 3 de 6 células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (Figura ratón 10a y b). En el resto de células, el disparo únicamente se producía por los canales de  $Na^+$ . El bloqueo completo de la actividad espontánea por TTX se observó en 4 de 8 células WT y en 3 de 6 células  $Ca_v1.3^{-/-}$  (Figura ratón 10c y d).



**Figura ratón 10. Contribución de los subtipos de canales  $Ca_v1$  a la actividad marcapasos.** (a-b) La actividad oscilatoria espontánea resistente a TTX obtenida en la mitad de las células tratadas con esta toxina, era abolida de manera reversible por nifedipino 300 nM en las células WT (a) y o  $Ca_v1.3^{-/-}$  (b). En la otra mitad de células, se alcanzó el bloqueo reversible de los PAs espontáneos con TTX 2  $\mu$ M en las células WT (c) y o  $Ca_v1.3^{-/-}$  (d).

**7. Los canales  $Ca_v1.3$  son los que contribuyen principalmente a la carga de  $Ca^{2+}$  y a la exocitosis de vesículas cromafines a potenciales de membrana negativos, mientras que los canales  $Ca_v1.2$  contribuyen a potenciales más positivos**

Al igual que hicimos antes, durante el registro de las corrientes de  $Ca^{2+}$  en el protocolo I-V mencionado en la *Figura ratón 5*, registramos  $C_m$  de forma simultánea, de manera que pudimos medir la exocitosis evocada en condiciones control en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$  a los diferentes voltajes (*Figura ratón 11b*). La contribución al proceso excitotico de los subtipos  $Ca_v1.3$  era del 71.7% a -20 mV y del 57.7% a -10 mV, mientras que la contribución de estos canales a la densidad de carga total era tan solo del 35.3% y del 30.2%, respectivamente (*Figura ratón 11a*). Estos datos reflejan un papel más importante de los canales  $Ca_v1.3$  en el control de la exocitosis a potenciales de membrana más hiperpolarizados. En la *Figura ratón 11c* pueden verse los registros originales de los trazados de  $C_m$  y de la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$ . Por encima de -10 mV, el control de la exocitosis por los canales  $Ca_v1$  se ve restringido a los canales  $Ca_v1.2$ , tal y como muestra la superposición de las curvas I-V (*Figura ratón 11b*).



**Figura ratón 11. Contribución de los subtipos de canales  $Ca_v1$  a la carga de  $Ca^{2+}$  y a la exocitosis de las vesículas cromafines en ratón.** La densidad de carga de  $Ca^{2+}$  **(a)** y su correspondiente exocitosis **(b)** respecto del voltaje, en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ . Los datos se normalizaron como el porcentaje de densidad de carga en condiciones control a 10 mV, expresados como la media  $\pm$  SEM. **(c)** Registros originales de densidad corriente de  $Ca^{2+}$  y su correspondiente exocitosis evocada a -20 mV, -10 mV y 0 mV en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ .

## **DISCUSIÓN DE LOS EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN**

Trabajos anteriores han descrito la dependencia de voltaje de la activación o las propiedades cinéticas de isoformas de canal  $Ca_v1$  en sistemas heterólogos (Koschak y col., 2001; Xu y Lipscombe, 2001) e incluso en algunos tipos de células primarias (Mangoni y col., 2003; Olson y col., 2005), pero lejos de eso, nuestro estudio ofrece la caracterización más completa de la función de este canal en un verdadero sistema fisiológico celular nativo.

Aquí concluimos que los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  son los subtipos de canal  $Ca_v1$  expresados en las células cromafines de ratón. Las evidencias de esta conclusión son: i) anticuerpos frente a las subunidades  $Ca_v1.1\alpha1$ ,  $Ca_v1.2\alpha1$ ,  $Ca_v1.3\alpha1$  y  $Ca_v1.4\alpha1$  sólo revelaron la presencia de las subunidades  $Ca_v1.2\alpha1$  y  $Ca_v1.3\alpha1$ ; II) el bloqueo de la densidad de carga de la corriente de  $Ca^{2+}$  producido por nifedipino 3  $\mu M$  se redujo en las células  $Ca_v1.3^{-/-}$  con respecto a las células WT, indicando que los canales que no eran  $Ca_v1.3$  eran del subtipo  $Ca_v1.2$ .

Vimos que los canales  $Ca_v1.3$  se activaban a potenciales de membrana más hiperpolarizados que los canales del subtipo  $Ca_v1.2$ . Esto se reflejó en el desplazamiento hacia la derecha de la curva I-V registrada en condiciones control en las células  $Ca_v1.3^{-/-}$  con respecto a la obtenida para las células WT, alcanzando valores de activación ( $V_{threshold}$ ) de  $-23.6 \pm 1.4$  mV y  $-16.4 \pm 1.8$  mV (más -21 mV para corregir el potencial de liquid junction) para las células WT y las  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente. Esta diferencia de voltaje era menor que la descrita en otros sistemas celulares, probablemente debido a la baja expresión de los canales  $Ca_v1.3$  en las células cromafines de ratón. En células del nodo sino-atrial, Mangoni y colaboradores (2003) revelaron que las corrientes  $Ca_v1$  se activaban sobre los -50 mV (en células WT) y cerca de los -20 mV (en células  $Ca_v1.3^{-/-}$ ) en una solución con 1.8 mM de  $Ca^{2+}$ . En sistemas heterólogos, empleando una solución de 15-20 mM de  $Ba^{2+}$ , el potencial de activación ( $V_{threshold}$ ) para los canales  $Ca_v1.3$  ha sido descrito como  $-45.7 \pm 0.5$  mV, y -31.5 mV para los canales  $Ca_v1.2$  (Koschak y col., 2001). Xu y Lipscombe (2001) observaron que el inicio de

la activación de los canales  $Ca_v1.3$  estaba en torno a los  $-55$  mV en  $5$  mM de  $Ba^{2+}$  (o  $2$  mM de  $Ca^{2+}$ ), mientras que los canales  $Ca_v1.2$  comienzan a activarse cerca de los  $-35$  mV.

Los canales del tipo  $Ca_v1.2$  se inactivan más rápido que los  $Ca_v1.3$ , un efecto que podía verse enmascarado en las células WT por la lenta inactivación de los canales  $Ca_v1.3$ . En sistemas heterólogos se han observado diferencias en la inactivación de los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ . Los canales  $Ca_v1.3$ , debido a una más pronunciada dependencia de  $Ca^{2+}$  de la inactivación, pueden ser inactivados más rápido al emplear  $Ca^{2+}$  como portador de carga, pero la dependencia de voltaje de la inactivación (registrada en  $Ba^{2+}$ ) parecía más lenta que en los canales  $Ca_v1.2$  (Yang y col., 2006; Koschak y col., 2001; Xu and Lipscombe, 2001; Singh y col., 2008). En sistemas nativos, como en el nodo sino-atrial y en el páncreas, se ha visto que los canales  $Ca_v1.3$  poseen una fuerte dependencia del  $Ca^{2+}$  para su inactivación (Plant, 1988; Zhang y col., 2002; Mangoni y col., 2003), mientras que en células del oído esta dependencia de  $Ca^{2+}$  parece ser mucho más débil o estar ausente (Platzer y col., 2000; Marcotti y col., 2003; Michna y col., 2003; Song y col., 2003). Esto podría deberse a la inhibición de la dependencia de  $Ca^{2+}$  por unión a proteínas del  $Ca^{2+}$ , ya que la coexpresión de la subunidad  $Ca_v1.3\alpha1$  con sintaxina/VAMP/SNAP también parece reducir esta inactivación (Song y col., 2003). Nuestros resultados podrían sugerir que las subunidades auxiliares, u otras proteínas asociadas a canales, podrían estar condicionando de manera significativa la cinética de inactivación en este sistema nativo, dando así diferencias con respecto a los canales expresados en sistemas heterólogos.

Exploramos la función de los canales  $Ca_v1$  en relación a la excitabilidad celular y la exocitosis. Respecto a la excitabilidad, los canales  $Ca_v1.2$  muestran un mayor acoplamiento a los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de tipo BK (bloqueo de los BK con nifedipino  $3 \mu M$  del 53% y el 35%, en células WT y  $Ca_v1.3^{-/-}$ , respectivamente). Este mayor acoplamiento de los canales  $Ca_v1.2$  se refleja también en los idénticos parámetros de los PAs obtenidos tras el tratamiento con nifedipino ( $300$  nM o  $3 \mu M$ ) en ambos tipos celulares. Así, el acoplamiento entre los canales BK y los  $Ca_v1.2$  observado aquí podría explicar el cambio en la forma

de los PAs producido por nifedipino, de manera que enlentece la repolarización del PA, con el consecuente ensanchamiento de la espiga (Figura ratón 8 y *Tabla 2*).

Este acoplamiento podría también explicar, al menos en parte, la despolarización de la membrana plasmática producida por la DHP. Se sabe que el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a menudo resulta en un ensanchamiento del PA (Sah y McLachlan 1992; Shao y col., 1999; Faber y Sah, 2002; Faber y Sah, 2003; Sun y col., 2003; Goldberg y Wilson, 2005). A pesar de este efecto opuesto al esperado tras el bloqueo de la entrada de iones de carga positiva, esto refleja un potente acoplamiento de los canales BK, de manera que el efecto neto es inhibir una corriente neta de salida, el flujo de  $\text{K}^+$  producido por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , tal y como ya se ha visto anteriormente (Jackson y col., 2004). La despolarización causada por la DHP podría afectar otras conductancias con la consecuencia de reducir la frecuencia de disparo de los PAs (Bean, 2007). Así, los canales  $\text{Ca}_v1.2$  modelan la forma de los PAs mediante su acoplamiento a los canales BK.

El disparo de los PAs estaba controlado principalmente por los canales  $\text{Ca}_v1.2$ . Esta conclusión se apoya en los siguientes puntos: a) el número de células que mostraban PAs espontáneos y la frecuencia de disparo de éstos era similar en las dos cepas de ratón; 2) los canales  $\text{Ca}_v1$  representaban el 81% de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  al potencial umbral en la mitad de las células, con una mayor contribución de los canales  $\text{Ca}_v1.2$  (64% y 17% debida a  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ , respectivamente); 3) el disparo de PAs espontáneos se bloqueaba completamente con TTX en la mitad de células WT y  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ , o era dirigido por la toxina hacia una actividad oscilatoria en la otra mitad de las células WT y  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ , mostrando que la ausencia de los canales  $\text{Ca}_v1.3$  no impide el disparo en las células; y finalmente, la actividad oscilatoria era abolida por nifedipino en ambos tipos celulares, lo que refleja que esta actividad estaba mediada por los canales  $\text{Ca}_v1.2$ . La actividad oscilatoria sensible a DHP se ha descrito también en neuronas del núcleo dorsomedial supraquiasmático (Jackson y col., 2004) o en neuronas dopaminérgicas adultas, pero no juveniles, de la sustancia negra (Chan y col., 2007). Esto podría indicar que las células que exhiben un disparo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  podrían encontrarse en un estado del desarrollo más tardío que aquellas en

las cual el  $\text{Ca}^{2+}$  no contribuye al disparo.

En este trabajo, también vemos que los canales  $\text{Ca}_v1.3$  juegan un papel principal en el control de la exocitosis a potenciales de membrana hiperpolarizados. La contribución de los canales  $\text{Ca}_v1.3$  a la exocitosis a  $-20$  mV y  $-10$  mV era el doble que su contribución a la densidad de carga a esos voltajes. Por encima de  $0$  mV, el control de la exocitosis por los canales  $\text{Ca}_v1$  está restringido al subtipo  $\text{Ca}_v1.2$ . De manera que los subtipos de canales  $\text{Ca}_v1$  son capaces de regular la exocitosis operando a diferentes rangos de voltaje.

En el presente estudio, observamos papeles diferentes para los subtipos  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  en el disparo de los PAs y en la secreción de neurotransmisores. En las células del nodo sinoatrial, los canales  $\text{Ca}_v1.3$  son el subtipo de canal  $\text{Ca}_v1$  que controla la actividad marcapasos (Mangoni y col., 2003), pero sin embargo, los canales  $\text{Ca}_v1.3$  muestran una fuerte inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en esas células (Zhang y col., 2002; Mangoni y col., 2003). De manera similar, en nuestro estudio, los canales  $\text{Ca}_v1.2$  son el subtipo de canal  $\text{Ca}_v1$  que mostró una inactivación más rápida, y consecuentemente, ellos podrían contribuir más rápido a la inactivación dependiente de voltaje de los canales de  $\text{Na}^+$ . Los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  son los esenciales para el inicio de los PAs dependientes de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Ca}^{2+}$  y para mantener el disparo repetitivo. Finalmente, los canales  $\text{Ca}_v1.3$  serían el subtipo que más controlaría la secreción a potenciales negativos, ya que ellos son los que contribuyen más a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a esos potenciales, y por tanto, al proceso secretor de neurotransmisores dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .



## **CONCLUSIONES DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EN RATÓN**

1. Identificamos los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  como los únicos subtipos de canal  $Ca_v1$  expresados en las células cromafines de ratón.

2. Los canales del subtipo  $Ca_v1.3$  se activan a potenciales más negativos y se inactivan más lentamente que los canales del subtipo  $Ca_v1.2$ .

3. Los canales  $Ca_v1$ , principalmente el subtipo  $Ca_v1.2$ , controlan la excitabilidad de la célula por acoplamiento funcional a los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  del tipo BK.

4. Los canales  $Ca_v1.2$  juegan un papel importante en el disparo de los PAs espontáneos.

5. Finalmente, los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  controlan el proceso de exocitosis a potenciales despolarizados ( $<10$  mV) e hiperpolarizados ( $>10$  mV), respectivamente.

En resumen, los datos obtenidos en esta parte de la Tesis revelan los papeles claves pero diferenciales de los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  en la mediación de eventos de disparo de PAs y en la exocitosis en la célula cromafín de ratón.

**PARTE II. EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE HUMANO**

## RESULTADOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE HUMANO

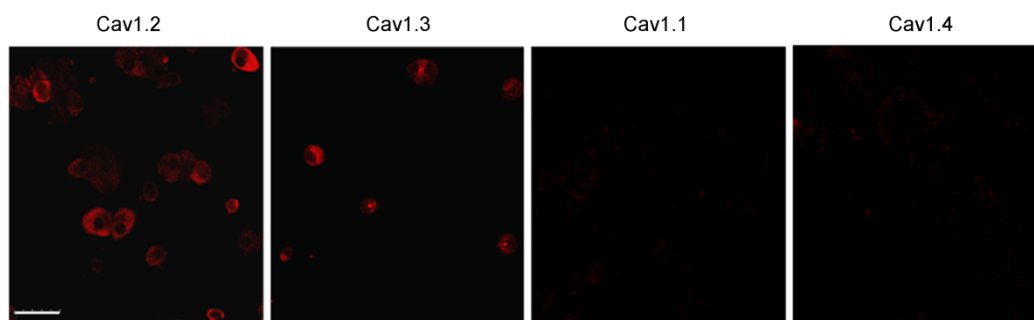
En esta segunda parte voy a presentar el estudio realizado en las células cromafines de glándulas adrenales humanas.

A pesar de la relevancia de los canales  $Ca_v1$ , aún no se ha realizado un estudio de las características biofísicas y funcionales, o sobre el bloqueo de por las DHPs de estos canales nativos en células cromafines humanas. Nuestro grupo ha querido investigar estos temas sobre células nativas humanas de la glándula adrenal, neuronas simpáticas inervadas por el nervio esplácnico que prepara a nuestro organismo para responder ante una situación de estrés. Para ello, mediante experimentos de “patch-clamp” y empleando un cóctel de bloqueantes de CCDV, además del clásico método de sustracción de DHPs, conseguimos aislar los canales  $Ca_v1$  en estas células para su estudio.

En sistemas nativos, los canales  $Ca_v1$  se han caracterizado clásicamente por sustracción de la corriente  $Ca^{2+}$  registrada en presencia de la DHP de la corriente control. Sin embargo, empleando este método para aislar el canal, la cinética y la dependencia de voltaje de la sensibilidad de las DHPs pueden influir en las propiedades observadas de los canales  $Ca_v1$ . Para evitar esta dependencia de voltaje de las DHPs y el lento bloqueo que producen cuando se aplican breves estímulos fisiológicos (Helton y col., 2005), utilizamos un cóctel de bloqueantes de CCDV para aislar las corrientes. De esta manera, pudimos conseguir nuevos datos sobre la fisiología de los canales  $Ca_v1$  nativos y del efecto de las DHPs en ellos.

### **1. Los canales $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$ conforman la corriente $Ca_v1$ en las células cromafines de humano.**

Empleamos anticuerpos frente a los diferentes subtipos de canal  $Ca_v1$  ( $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v1.4$ ) en las células cromafines de humano. Se observó marcaje de las células con anticuerpos frente a  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ , pero no frente a los canales  $Ca_v1.1$  y  $Ca_v1.4$  (*Figura humano 1*).



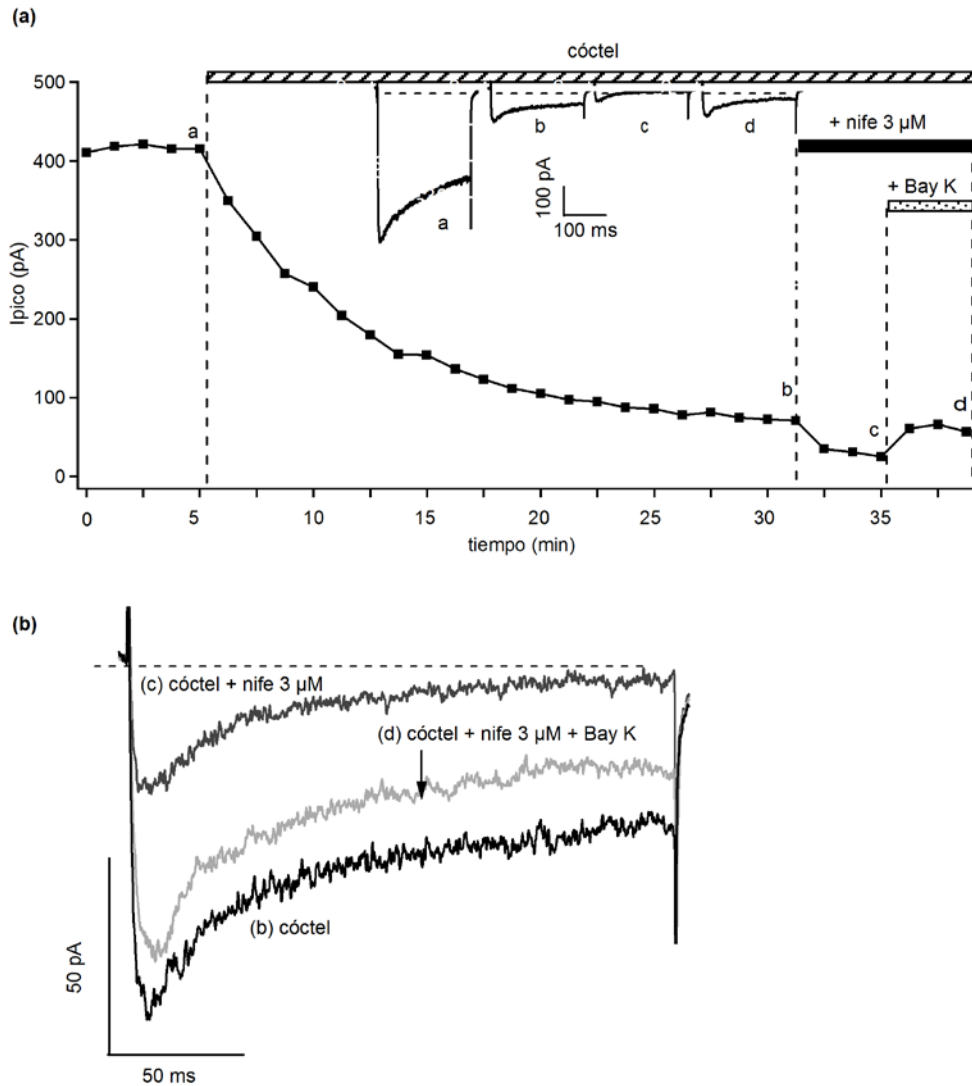
**Figura humano 1. Caracterización inmunocitoquímica de los subtipos de canales Cav1 expresados en células cromafines humanas.** Imágenes de microscopía confocal de células aisladas de humano. Marcaje con anticuerpos frente a  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v1.4$  y el correspondiente anticuerpo secundario. Escala: 25 micras.

## 2. Aislamiento de los canales $Ca_v1$ con el cóctel de bloqueantes de CCDV

Estudiamos la dependencia del voltaje de los canales de tipo  $Ca_v1$ , y para ello, aislamos el canal  $Ca_v1$  empleando un cóctel de bloqueantes de CCDV. Este cóctel se perfundía hasta que la corriente de  $Ca^{2+}$  era estable, lo que normalmente ocurría tras unos 15 min. El cóctel contenía  $\omega$ -Aga-IVA (200 nM, para bloquear los canales de tipo  $Ca_v2.1$ ),  $\omega$ -CTX-MVIIC (3  $\mu$ M, para bloquear los canales  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ ),  $\omega$ -CTX-GVIA (1  $\mu$ M, para bloquear los canales  $Ca_v2.2$ ) y SNX-483 (300 nM, para bloquear los canales  $Ca_v2.3$ ). El empleo de estas concentraciones se justifica en trabajos anteriores de nuestro grupo, donde se empleaban en células cromafines de humano (Pérez-Alvarez y col., 2008) y de ratón (Pérez-Alvarez y col., 2011; Hernández-Vivanco y col., 2012) para bloquear CCDV del grupo de canales activados por alto voltaje.

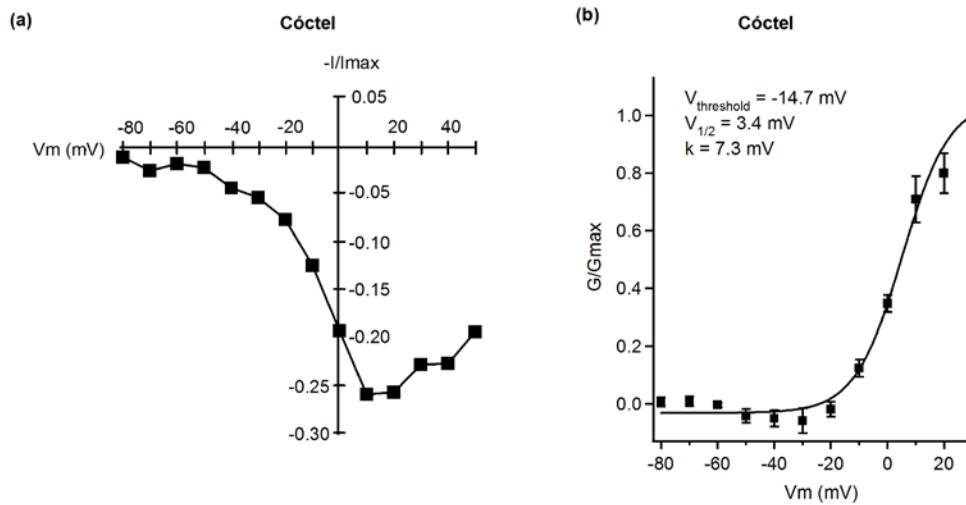
El protocolo empleado consistía en la aplicación de pulsos despolarizantes cuadrados de 200 ms al potencial del pico de corriente, conseguíamos evocar las corrientes de  $Ca^{2+}$ . En la *Figura humano 2* se muestra el curso temporal del bloqueo ejercido por el cóctel de bloqueantes sobre la corriente de  $Ca^{2+}$  (a), así como los registros originales de una célula típica en las diferentes condiciones (b). Este cóctel disminuyó la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  un  $85.4 \pm 1.4\%$  ( $n=22$ ), indicando que el canal  $Ca_v1$  aislado contribuye un 14.6% a la corriente total. El canal  $Ca_v1$  aislado se bloqueó por nifedipino 3  $\mu$ M un  $39.8 \pm 6\%$  ( $n=4$ ), y la corriente que quedaba tras la aplicación del nifedipino y el cóctel podía

recuperarse completamente al perfundir el agonista dihidropiridínico Bay K 8644 1  $\mu\text{M}$  (potenciación  $197 \pm 0.2\%$ ,  $n=4$ ), reflejando que esta corriente resistente corresponde a los canales  $\text{Ca}_v1$  no bloqueados por nifedipino.



**Figura humano 2. Aislamiento del canal  $\text{Ca}_v1$  humano empleando un cóctel de bloqueantes de CCDV.** (a) Curso temporal del bloqueo de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  al pico ejercido por el cóctel de bloqueantes de CCDV solo, en presencia de nifedipino y en presencia de nifedipino más Bay K 8644. (b) Registros originales de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  medidos en la misma célula que en el panel a obtenidos bajo diferentes condiciones.

El bloqueo por nifedipino y la potenciación por Bay K de la corriente resistente se observó tras aplicar diferentes potenciales test desde  $-20 \text{ mV}$  hasta  $+50 \text{ mV}$ , con incrementos de  $10 \text{ mV}$  (Figura humano 3).



**Figura humano 3. Dependencia de voltaje de la activación de los canales  $Ca_v1$  en la célula cromafín humana. Se aplicaron pulsos despolarizantes de 20 ms aplicados cada 10 s en incrementos de 10 mV desde -80 mV hasta +50 mV ( $V_h = -80$  mV). (a) Curva I-V media obtenida tras la perfusión de las células con el cóctel de bloqueantes. Datos normalizados como el porcentaje de corriente máxima obtenido. (b) Ajuste a la función de Boltzmann obtenido a partir de las curvas I-V del *panel a*.**

### 3. Dependencia del voltaje de los canales $Ca_v1$

Para estudiar la dependencia del voltaje de los canales  $Ca_v1$ , se aplicaron pulsos de 20 ms cada 10 s desde -80 mV hasta +60 mV. Se obtuvo la corriente a diferentes potenciales bajo condiciones control, tras la perfusión del cóctel de bloqueantes y tras el cóctel copperfundido con nifedipino 3  $\mu$ M en ausencia o en presencia de Bay K 8644 1  $\mu$ M. Las curva I-V obtenida tras la perfusión del cóctel se puede ver en el panel (a) de la *Figura humano 3*. La dependencia del voltaje del pico de conductancia (G) del canal  $Ca_v1$  se obtuvo a partir del pico de esta relación I-V, y se calculó por ajuste a una función de Boltzmann (*Figura humano 3f*), de acuerdo a la *ecuación 1* (ver sección de “materiales y métodos”). Este ajuste estima un  $V_{1/2}$  de 3.4 mV y una k de 7.3 mV para los canales nativos  $Ca_v1$  humanos. Utilizando estos valores, calculamos el potencial de activación ( $V_{threshold}$ ), el potencial al cual se activa el 5% de la conductancia máxima ( $G_{max}$ ), obteniendo un valor de -14.7 mV.

Calculamos la contribución de los canales  $Ca_v1$  a la corriente total de  $Ca^{2+}$  a los diferentes voltajes a partir de las curvas I-V de la corriente control y de la corriente aislada con el cóctel. Se obtuvieron valores de 17%, 14%, 12%, 11% y 8% a -10 mV, 0 mV, 10 mV, 20 mV y 30 mV, respectivamente (n=4-5). Por tanto, los canales  $Ca_v1$  contribuyen principalmente a la corriente total de  $Ca^{2+}$  a -10 mV, y ésta contribución disminuye gradualmente con el aumento de voltaje.

#### 4. Los canales $Ca_v1$ no contribuyen al disparo de PAs espontáneos y pueden ser activados al utilizar un único PA como estímulo

Se ha visto que las células cromafines humanas muestran PAs espontáneos (Biales y col., 1976), y como hemos visto en la parte de los experimentos de ratón presentados en esta Tesis, los canales  $Ca_v1$  contribuyen al disparo de los PAs espontáneos en las células cromafines murinas (Pérez-Alvarez y col., 2011). Biales y colaboradores no determinaron el porcentaje de células que mostraban PAs espontáneos. Vieron que la mayoría de las células tenían potenciales en reposo en el rango de -10 a -40 mV. En nuestro estudio, solo un 19% de las células cromafines probadas mostraban PAs espontáneos (5 de 26 células). Un registro típico de la actividad espontánea puede verse en la *Figura humano 4a*. Se analizaron los siguientes parámetros de los PAs espontáneos: la velocidad de despolarización, el potencial máximo, el potencial mínimo, la altura, la anchura a media altura, y la cadencia de disparo (*tabla 1*). El potencial de membrana en reposo de las células que mostraban PAs espontáneos era de  $-40.5 \pm 1.9$  mV (n=5), valor que no difería del de las células que no mostraban actividad espontánea ( $-41.4 \pm 0.2$  mV, n=21 cells).

**Tabla 1. Parámetros cinéticos de los PAs espontáneos obtenidos en condiciones control en células cromafines humanas.**

Depol.rate (V/s)	Overshoot (mV)	HH Width (ms)	Height (mV)	Undershoot (mV)	Repol.rate (V/s)	Firing rate (Hz)
25.9±4.8	10.1±2.4	4.8±0.3	59.7±3.0	-50.5±0.9	-19.9±0.9	1.03±0.8

Depol. rate: velocidad máxima de despolarización; Overshoot: potencial máximo; HH Width: anchura a media altura; Height: altura total; Undershoot: potencial mínimo; Repol.rate: velocidad máxima de repolarización; Firing rate: frecuencia de disparo.

Mediante un protocolo de "AP-clamp" estudiamos la contribución de los canales  $Ca_v1$  al disparo de PAs. El estímulo aplicado en estos experimentos era el PA media de 10 PAs por célula ( $n=5$ ) (*Figura humano 4b*). Para identificar el potencial umbral (marcado por flechas) construimos un gráfico "phase-plane plot" (*Figura humano 4c*). El potencial umbral obtenido fue de  $-34$  mV.

Para aislar las corrientes de  $Ca^{2+}$  que se activaban durante el PA empleado como estímulo, las células se perfundieron inicialmente con una solución que contenía TTX  $2\mu M$  para bloquear las corrientes de  $Na^+$  y TEA  $45$  mM para bloquear las corrientes de  $K^+$  (control+TTX+TEA). A continuación, se incluyó nifedipino  $3\mu M$  en la solución de perfusión (control+TTX+TEA+Nife), y finalmente,  $CdCl_2$   $200\mu M$  (control+TTX+TEA+Cd) (*Figura humano 4d*). Las corrientes iónicas se calcularon de la siguiente manera: para obtener la corriente de  $Ca^{2+}$  total, se sustrajo la corriente obtenida con la solución "control solution+TTX+TEA+Cd" de la obtenida al perfundir la solución "control+TTX+TEA". La corriente  $Ca_v1$  se obtuvo de la diferencia entre la solución "control-TTX-TEA" y la solución "control+TTX+TEA+Nife". Con el cálculo de estas corrientes pudimos ver que al potencial umbral no existían corrientes de tipo  $Ca_v1$  ni corrientes de tipo no- $Ca_v1$  ( $n=6-8$ ) (*Figura humano 4e*). Sin embargo, como se mencionó antes, el potencial de reposo de las células cromafines humanas es más despolarizado que el potencial de fijación empleado en estos experimentos ( $-80$  mV), y por tanto, analizamos la contribución de los canales  $Ca_v1$  al disparo de los PAs a un potencial de fijación de  $-50$  mV. A este  $V_h$  los canales de  $Ca^{2+}$  tampoco contribuían al disparo de los PAs ( $n=11$ ) (*Figura humano 4e*).

Sin embargo, el empleo del método de sustracción de DHPs para el análisis de la contribución de los canales  $Ca_v1$  al disparo de los PAs espontáneos podría verse enmascarado por el lento bloqueo ejercido por las DHPs sobre las corrientes  $Ca_v1$  (Helton y col., 2005). Por tanto, decidimos realizar este estudio aislando la corriente  $Ca_v1$  con el cóctel de bloqueantes de CCDV, y empleando el protocolo de "AP-clamp", para ver si existía alguna diferencia. Sin embargo, empleando este método, tampoco se vio que los canales  $Ca_v1$  o no- $Ca_v1$  participaran en el disparo de los PAs, como se demuestra por la ausencia de corriente de  $Ca^{2+}$  alguna al potencial umbral (*Figura humano 4g*).



La contribución de los canales  $Ca_v1$  a la corriente de  $Ca^{2+}$  calculada por sustracción con nifedipino o mediante su aislamiento con el cóctel, empleando el protocolo de "AP-clamp" a un  $V_h=-80$  mV, da valores similares, del  $19\pm 2\%$  ( $n=4$ ) y  $21\pm 4\%$  ( $n=9$ ), respectivamente. Esta contribución era del  $41\pm 6\%$  empleando el método de sustracción de DHPs a un  $V_h=-50$  mV.

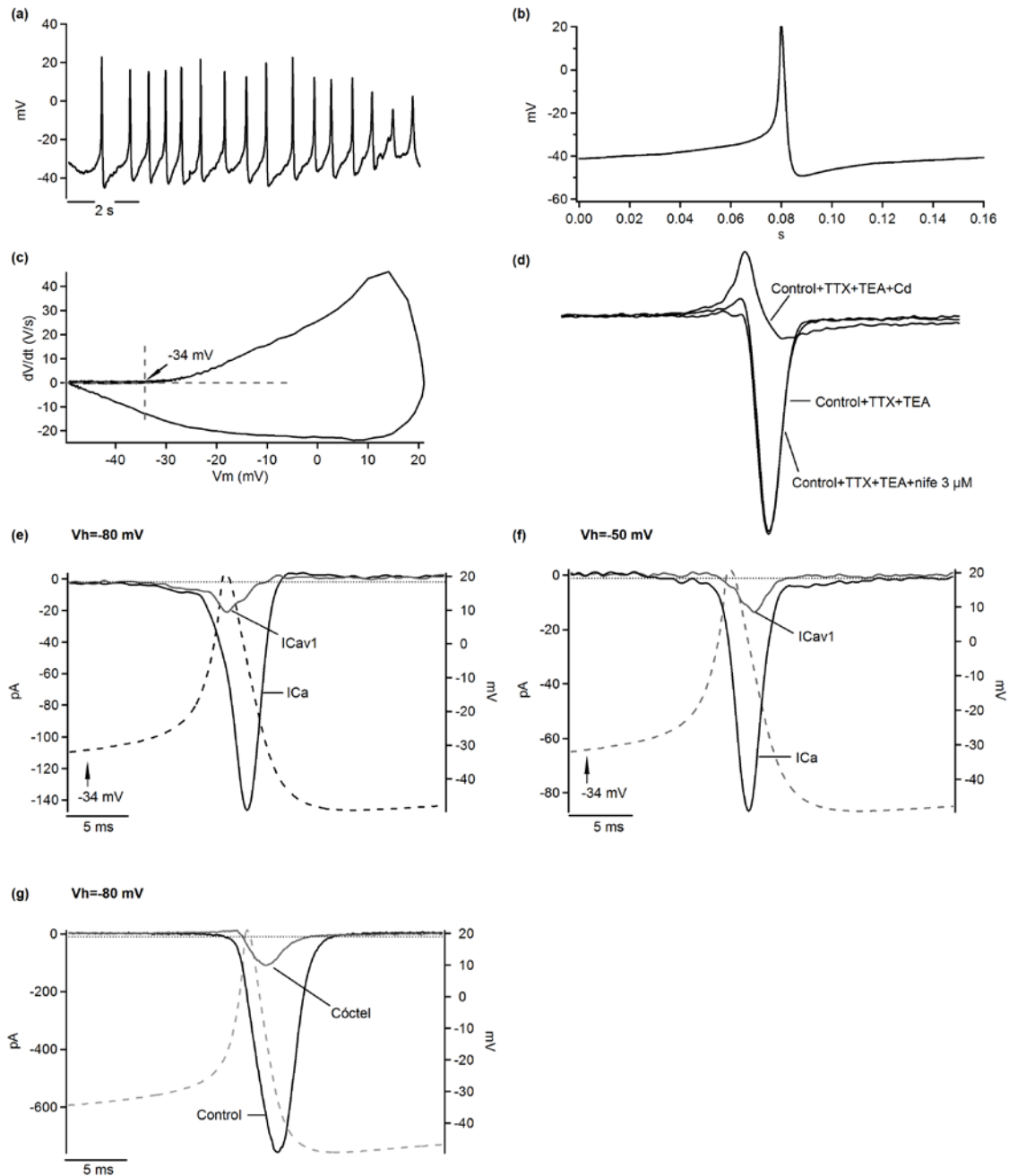
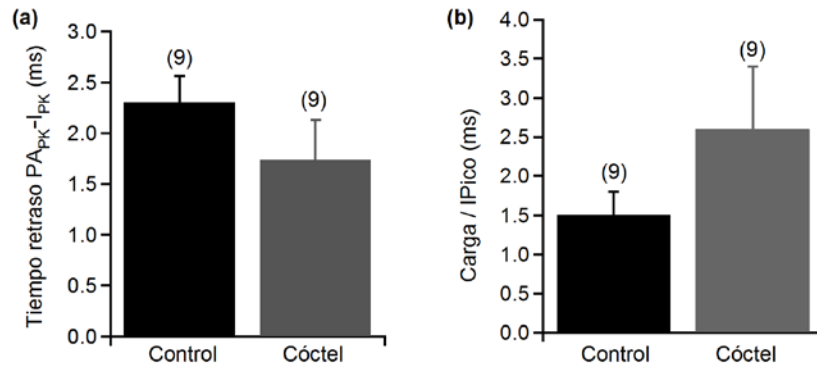


Figura humano 4. Los canales  $Ca_v1$  no contribuyen al disparo de los PAs espontáneos y pueden ser activados al estimular las células con un PA simple. (a) Registro original de PA

espontáneos obtenidos en células cromafines humanas en la configuración de fijación de corriente de la técnica de "patch-clamp". **(b)** PA medio obtenido de PAs registrados 10 s bajo condiciones control (n=5). **(c)** Diagrama de "phase-plane plot" obtenido al representar  $dV/dt$  frente al voltaje del estímulo. Las flechas indican el potencial umbral (-34 mV). **(d)** Experimentos de "AP-clamp" llevados a cabo al aplicar como estímulo el PA medio obtenido en condiciones control en el panel (b) cada 30 s.  $V_h = -80$  mV. **(e)** Las corrientes iónicas se calcularon a partir de registros como los del panel (d). El PA empleado como estímulo aparece superpuesto sobre las corrientes iónicas.  $V_h = -80$  mV (n=8). **(f)** El protocolo realizado es el mismo que en (e) pero con  $V_h = -50$  mV (n=11). **(g)** Protocolo de "AP-clamp" bajo condiciones control y en presencia del cóctel de bloqueantes (n=9).

### **5. Los canales del tipo $Ca_v1$ y no- $Ca_v1$ activados por PAs simples se abren a una velocidad similar y muestran una eficiencia análoga.**

En sistemas heterólogos, se ha visto que los canales  $Ca_v1$  se abren más rápido y son más eficientes cuando se activan por PAs simples (Helton y col., 2005). Sin embargo, en el presente estudio, calculamos el retraso que existe entre el pico del PA empleado como estímulo y el pico de la corriente de entrada de tipo  $Ca_v1$  evocada por el protocolo de "AP-clamp", y daba un valor de  $2.3 \pm 0.3$  ms (n=9) y  $1.7 \pm 0.4$  ms (n=9), respectivamente, para la corriente total  $Ca^{2+}$  y la corriente de los canales  $Ca_v1$ , ésta última aislada con el cóctel de bloqueantes de CCDV (no mostrando diferencias significativas) (*Figura humano 5a*). Para normalizar las diferencias de expresión entre cultivos celulares, la carga total evocada en respuesta a un PA simple se expresó en relación a la amplitud de la corriente al pico evocada por pulsos despolarizantes de 200 ms para cada célula. Los valores para la corriente total de  $Ca^{2+}$  y para la corriente  $Ca_v1$  fueron de  $1.5 \pm 0.3$  ms (n=9) y  $2.6 \pm 0.8$  ms (n=9), los cuales no mostraban diferencias significativas (*Figura humano 5b*).



**Figura humano 5. Los canales Cav1 y no-Cav1 activados por PAs simples se abren con una velocidad similar y muestran eficiencias similares en la célula cromafín humana. (a)** Tiempo medio de retraso entre el pico del PA empleado como estímulo y el pico de la corriente de Ca<sup>2+</sup> evocada por este PA en condiciones control (se reclutan canales de tipo Ca<sub>v</sub>1 y de tipo no-Ca<sub>v</sub>1) y en presencia del cóctel de bloqueantes de CCDV (sólo se reclutan los canales Ca<sub>v</sub>1) (n=9). **(b)** Cociente medio de la carga durante un PA simple con respecto al pico de la corriente de entrada evocada por pulsos despolarizantes de 200 ms, registrados en el mismo experimento bajo condiciones control y tras la perfusión del cóctel (n=9). El número de experimentos aparece entre paréntesis sobre las barras.

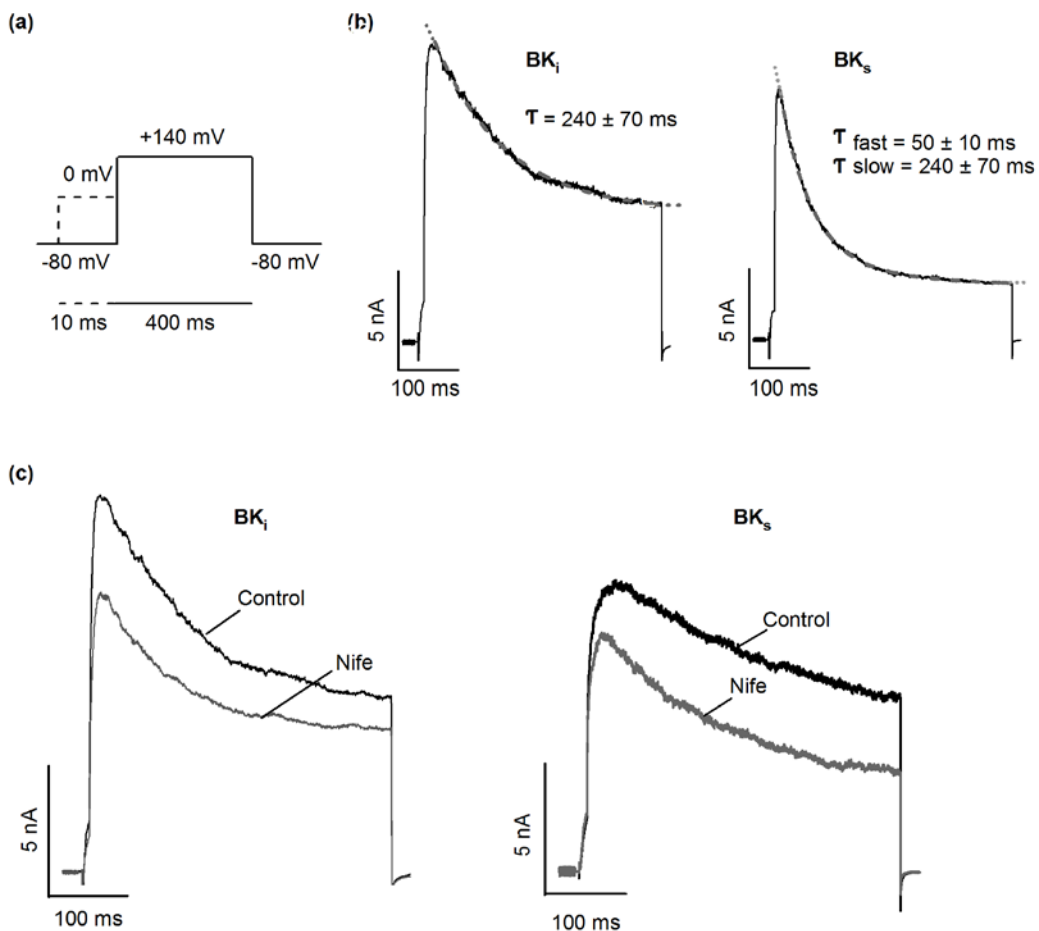
## 6. Los canales Ca<sub>v</sub>1 nativos humanos están acoplados a los canales BK

Los canales Ca<sub>v</sub>1 están acoplados a los canales BK en las células cromafines de rata (Solaro y col., 1995) y de ratón (Pérez-Alvarez y col., 2011). Aquí también investigamos si los canales Ca<sub>v</sub>1 mostraban un acoplamiento funcional con los canales BK en las células cromafines humanas.

Para reclutar los canales BK, realizamos el mismo protocolo que en el trabajo de ratón. Aplicamos prepulsos cortos de 10 ms a 0 mV antes de un pulso test (V<sub>t</sub>) de 400 ms a 140 mV (*Figura humano 6a*). Para comprobar que el Ca<sup>2+</sup> entraba exclusivamente durante el prepulso, aplicábamos primero un pulso que no estaba precedido por el prepulso, el cual no debería evocar secreción (reflejada en la medida simultánea de C<sub>m</sub>, que no mostramos). Los canales BK en las células cromafines humanas exhibían cinética de tipo inactivante (BK<sub>i</sub>) y no inactivante (BK<sub>s</sub>) como las que habían sido descritas en rata (Solaro y col., 1995). De las células probadas la mitad de ellas correspondían a un tipo y la otra mitad al

otro. Las corrientes  $BK_i$  se ajustaron a una curva exponencial obteniéndose una constante de inactivación de  $240 \pm 70$  ms ( $n=8$ , *panel 6b* de la izquierda), y las de tipo  $BK_s$  se ajustaban a una curva exponencial doble con constantes de inactivación de  $50 \pm 10$  ms y  $240 \pm 70$  ms ( $n=8-10$ , *panel 6b* de la derecha). La inactivación cuando se calculaba como el porcentaje de corriente al final del pulso con respecto al pico de corriente era del  $49.6 \pm 5.7\%$  ( $n=8$ ) y del  $47.5 \pm 5.6\%$  ( $n=10$ ) para las corrientes  $BK_i$  y  $BK_s$ , respectivamente (no existían diferencias significativas).

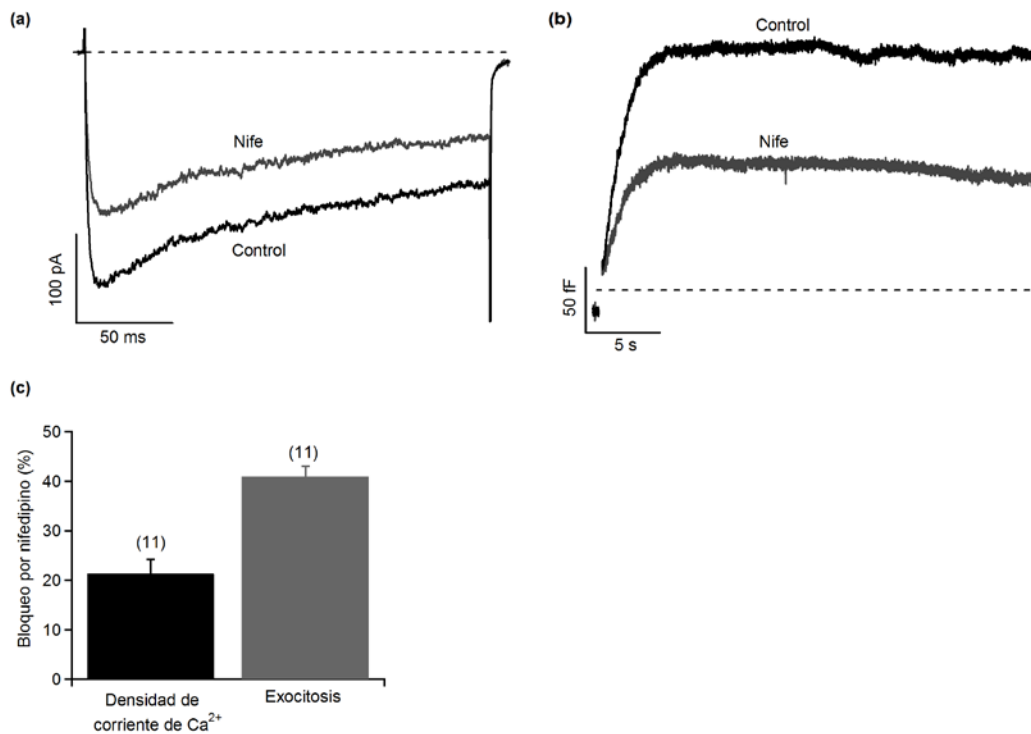
Las corrientes de ambos tipos se bloquearon de manera similar con nifedipino 3  $\mu$ M, alcanzando un  $53.5 \pm 6.9\%$  ( $n=5$ , *panel 6c* izquierdo) y un  $42.5 \pm 5.6\%$  ( $n=8$ , *panel 6c* derecho) respectivamente, reflejando que los canales BK y los canales Cav1 están acoplados funcionalmente en las células cromafines humanas.



**Figura humano 6. Acoplamiento de los canales  $Ca_v1$  a los canales BK en la célula cromafín humana.** (a) Esquema del protocolo de doble pulso de voltaje aplicado para reclutar los canales BK. Este incluye un pulso test ( $V_t$ ) de 400 ms a 140 mV, seguido de un prepulso de 10 ms a 0 mV aplicado antes de  $V_t$  (trazo discontinuo). (b) Registros originales de los dos tipos de corrientes de  $K^+$  medidas empleando el protocolo descrito en (a). Aparece superpuesto el ajuste de cada tipo de corriente como un trazo discontinuo. (c) Registros originales del bloqueo ejercido por nifedipino 3  $\mu$ M sobre las corrientes de tipo BKi (panel izquierdo, n=5) y sobre las corrientes BKs (panel derecho, n=8). (n=13).

## 7. Los canales nativos $Ca_v1$ humanos están funcionalmente colocalizados con la maquinaria de exocitosis

A la vez que registramos las corrientes de  $Ca^{2+}$ , pudimos realizar medidas de  $C_m$  para determinar la exocitosis evocada por la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales  $Ca_v1$ . Aplicamos pulsos despolarizantes de 200 ms cada 5 min al voltaje del pico de corriente. En la *Figura humano 7a y b* se muestran los registros originales de corrientes de  $Ca^{2+}$  y medidas de  $C_m$ , respectivamente. Tras la perfusión con nifedipino 3  $\mu$ M, la densidad de la corriente de  $Ca^{2+}$  y la exocitosis se bloquearon un  $21.4 \pm 2.8\%$  y un  $41 \pm 2\%$ , respectivamente (n=11, p=0.04). Estos datos muestran que los canales  $Ca_v1$  están colocalizados funcionalmente con la maquinaria de exocitosis en las células cromafines humanas.



**Figura humano 7. Los canales Ca<sub>v</sub>1 humanos contribuyen al proceso excitótico en la célula cromafín humana.** Registros originales de la corriente de Ca<sup>2+</sup> (a) y de la excitosis correspondiente (b) evocada por pulsos despolarizantes de 200 ms aplicados al pico de corriente bajo condiciones control y tras la perfusión con el cóctel de bloqueantes desde un V<sub>h</sub>=-80 mV (n=6).(c) Diagrama de barras mostrando la diferencia entre el bloqueo de la densidad de corriente y de la excitosis. El número de experimentos aparece entre paréntesis sobre las barras.

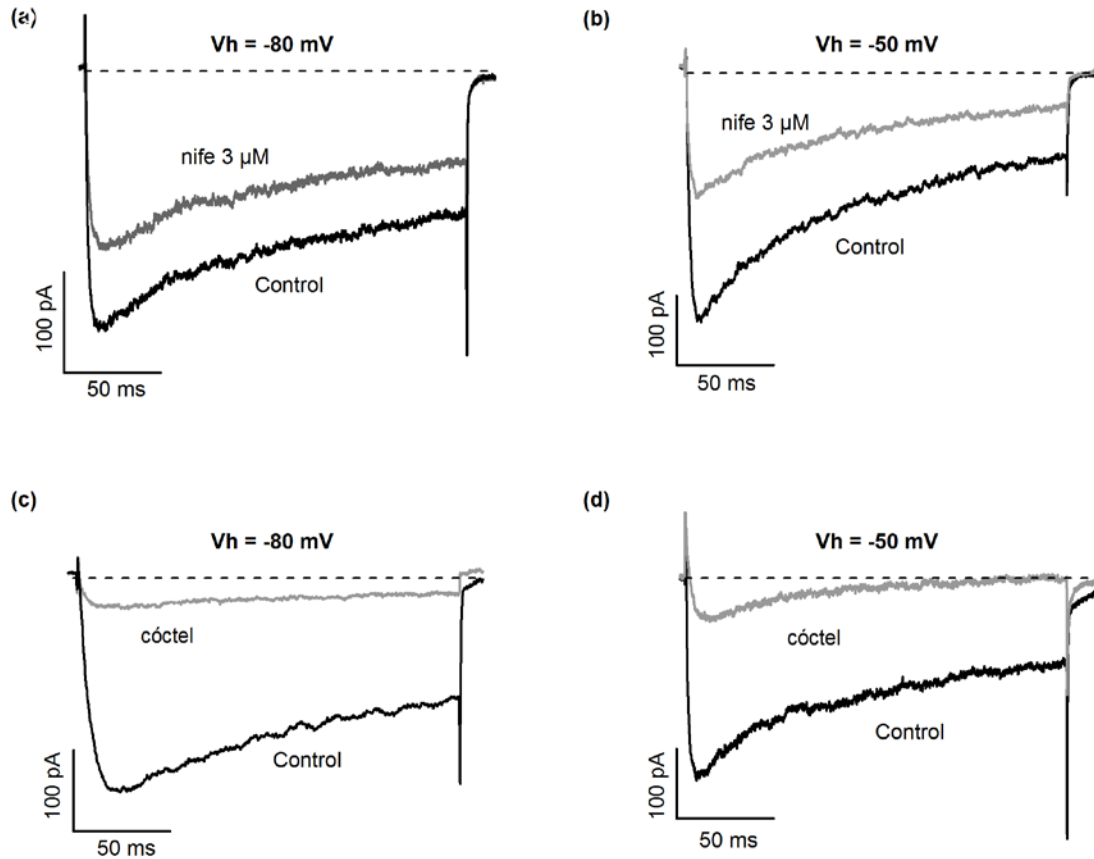
## 8. La contribución relativa de los canales Ca<sub>v</sub>1 a la corriente total de Ca<sup>2+</sup> es similar a potenciales hiperpolarizados o más despolarizados

El bloqueo de las DHPs depende fuertemente del voltaje, y por tanto, su uso enmascara la contribución real de los canales Ca<sub>v</sub>1 a diferentes potenciales. Al aplicar pulsos despolarizantes de 200 ms cada 3-5 min al voltaje del pico de corriente, nifedipino 3 μM bloqueaba la densidad de corriente al pico un 20±1.3% y un 50.6±6% a V<sub>h</sub>=-80 mV (n=44) y V<sub>h</sub>=-50 mV (n=8), respectivamente (p<0.001) (Figura humano 8a y b), confirmando la voltaje dependencia de esta DHP sobre los canales Ca<sub>v</sub>1 nativos, tal como se ha visto en canales Ca<sub>v</sub>1 no humanos (Bean, 1984).

Para investigar la contribución de los canales  $Ca_v1$  a los diferentes potenciales a diferentes  $V_h$  evitando la influencia de la dependencia de voltaje del bloqueo de las DHPs, probamos a aislar los canales  $Ca_v1$  con el cóctel de bloqueantes de CCDV. Cuando aplicábamos pulsos despolarizantes de 200 ms cada 3-5 min al voltaje del pico de corriente, el cóctel bloqueaba la densidad de corriente al pico a  $V_h=-80$  mV y  $V_h=-50$  mV un  $85.4\pm 1.4\%$  ( $n=22$ ) y un  $79\pm 6\%$  ( $n=5$ ), respectivamente (*Figura humano 8c y d*). No se observaron diferencias significativas entre el pico de corriente control obtenida en las células mantenidas a -80 mV y a -50 mV ( $n=27$  y 17, respectivamente). Tampoco existen diferencias entre la corriente al pico de los canales  $Ca_v1$  obtenidos con el cóctel de bloqueantes cuando se comparaban a los diferentes  $V_h$  ( $n=22$  y 5, respectivamente).

Las constantes de tiempo de inactivación de las corrientes de  $Ca^{2+}$  en condiciones control, activadas por los pulsos despolarizantes de 200 ms, registradas a -80 mV y a -50 mV, podían ajustarse bien a una función exponencial simple. Los valores no diferían para ambos  $V_h$ , siendo 114.8 ms ( $n=9$ ) y 102 ms ( $n=4$ ), respectivamente, a  $V_h=-80$  mV y  $V_h=-50$  mV. Tampoco existían diferencias en la inactivación de los canales calculada como porcentaje de corriente de  $Ca^{2+}$  resistente al final del pulso de 200 ms con respecto a la corriente al pico ( $I_{200}/I_{pico}$ ). Los valores en este caso eran  $49.6\pm 6\%$  ( $n=9$ ) y  $50\pm 8\%$  ( $n=4$ ), respectivamente, para  $V_h=-80$  mV y  $V_h=-50$  mV

La inactivación de las corrientes  $Ca_v1$ , aisladas con el cóctel de bloqueantes, no era diferente cuando se registraba a  $V_h$  de -80 o de -50 mV (los valores eran  $73.5\pm 10$  ms ( $n=7$ ) y  $49\pm 8$  ms ( $n=3$ ), respectivamente). Tampoco existían diferencias significativas cuando se calculaba la inactivación como el porcentaje de corriente de resistente al final del pulso de 200 ms con respecto a la corriente al pico ( $I_{200}/I_{pico}$ ). En este caso, los valores alcanzados eran de  $32\pm 9\%$  ( $n=7$ ) y  $34\pm 2\%$  ( $n=3$ ) a  $V_h=-80$  mV y  $V_h=-50$  mV, respectivamente.

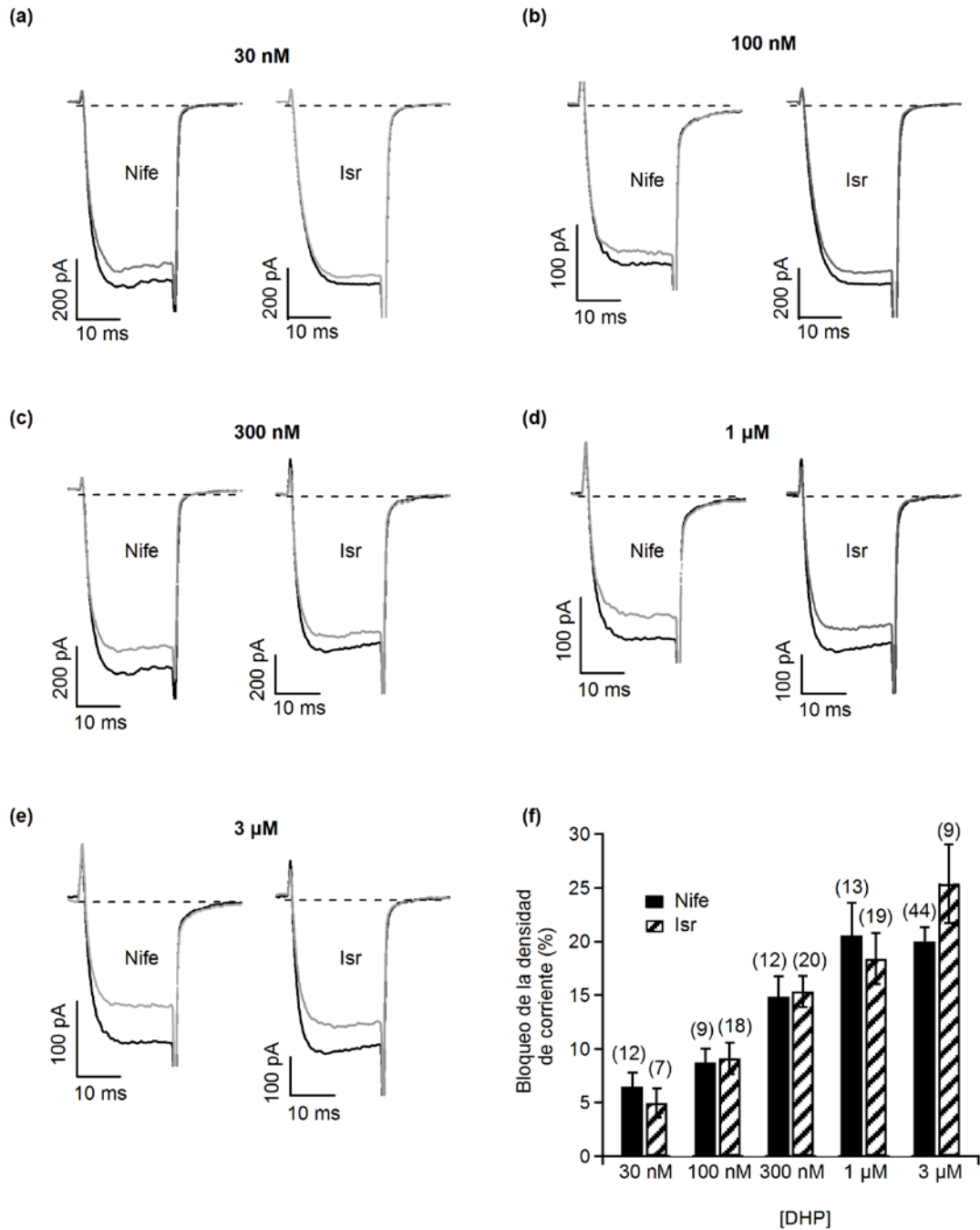


**Figura humano 8. La contribución relativa de los canales Ca<sub>v</sub>1 a la corriente de Ca<sup>2+</sup> total es similar a potenciales de fijación más hiperpolarizados o más despolarizados.** Registros originales de corrientes de Ca<sup>2+</sup> evocadas por pulsos despolarizantes de 200 ms en condiciones control y tras la perfusión de nifedipino 3 μM (a-b) o del cóctel de bloqueantes (c-d) desde un V<sub>h</sub>=80 mV o -50 mV (n=5-44).

### 9. Los canales nativos humanos de tipo Ca<sub>v</sub>1 se bloquean de forma idéntica por nifedipino e isradipino

Isradipino ha demostrado ser unas diez veces más potente que nimodipino en sistemas heterólogos (Koschak y col., 2001; Xu y Lipscombe, 2001). Para investigar como es el bloqueo de nifedipino en comparación con el alcanzado con isradipino en células humanas nativas, probamos concentraciones crecientes de ambas DHPs desde 30 nM a 3 μM sobre corrientes de Ca<sup>2+</sup> evocadas por pulsos despolarizantes de 20 ms al voltaje del pico de corriente (Figura humano 9a-e). Nifedipino e isradipino inhibían de forma similar los canales Ca<sub>v</sub>1 de manera dependiente de la dosis a las diferentes concentraciones (Figura humano 9f).





**Figura humano 9. Los canales  $Ca_v1$  nativos de humano se bloquean de manera idéntica por nifedipino que por isradipino. (a-e)** Registros originales del bloqueo de ambas DHPs a las diferentes concentraciones. **(f)** Diagrama de barras comparando la densidad de corriente al pico de ambas DHPs a las diferentes concentraciones (n=7-44). El número de experimentos se muestra entre paréntesis.

## **DISCUSIÓN DE LOS EXPERIMENTOS EN CÉLULAS CROMAFINES DE HUMANO**

Los canales  $Ca_v1$  se han estudiado mucho en sistemas heterólogos y en células nativas no humanas. Sin embargo, poco es lo que se ha investigado en células humanas nativas. El presente estudio se ha centrado en los canales  $Ca_v1$  de células cromafines humanas obtenidas de glándulas de donantes de órganos. Tras estudiar los procesos dependientes de voltaje, procedimos al aislamiento de los canales  $Ca_v1$  mediante el cóctel de bloqueantes de CCDV.

Observamos que el potencial de activación ( $V_{\text{threshold}}$ ) de los canales  $Ca_v1$  nativos humanos es de -14.7 mV empleando 5 mM de  $Ca^{2+}$  como portador de carga en la solución de perfusión. Empleando las mismas condiciones experimentales que en los apartados previos con células murinas, se obtuvieron corrientes con un potencial de activación de  $-23.6 \pm 1.4$  mV en células de tipo WT y de  $-16.4 \pm 1.8$  mV en células carentes del gen para la subunidad  $Ca_v1.3$  (Pérez-Alvarez y col., 2011). Los valores obtenidos por nosotros en sistemas nativos, son superiores que los observados para los canales  $Ca_v1$  en sistemas heterólogos. Por ejemplo, el potencial de activación para los canales  $Ca_v1.3$  se determinó en  $-45.7 \pm 0.5$  mV, y  $-31.5$  mV para los canales  $Ca_v1.2$  empleando en las soluciones 15-20 mM de  $Ba^{2+}$  (Koschak y col., 2001). Xu y Lipscombe (2001) observaron que el inicio de la activación tenía lugar aproximadamente a -55 mV en 5 mM de  $Ba^{2+}$  (o 2 mM de  $Ca^{2+}$ ), mientras que los canales  $Ca_v1.2$  comenzaban a activarse cerca de los -35 mV.

También podemos ver que el potencial de activación calculado en el presente estudio empleando el cóctel de bloqueantes de CCDV para aislar el canal  $Ca_v1$  es casi 20 mV más despolarizado que el obtenido en experimentos en células cromafines humanas bajo idénticas condiciones experimentales, en los que se empleaba el clásico método de sustracción de DHPs para aislar este tipo de canal (-32.8 mV, valor obtenido en Pérez-Alvarez y col., 2008). En ese estudio previo de nuestro grupo, el valor de  $V_{1/2}$  de los canales  $Ca_v1$  (-13.6 mV) era similar al encontrado en neuronas del hipocampo de la zona CA3-CA1 de rata (-14.2 mV) (Mermelstein y col., 2000) calculado por sustracción con DHPs, pero pasa a

ser 3.4 mV en las células cromafines humanas cuando se mide directamente sobre los canales  $Ca_v1$  (presente estudio). Con este nuevo método, el análisis no se ve afectado por la dependencia del voltaje (Bean, 1984; Sanguinetti y Kass, 1984) o por las propiedades de bloqueo de las DHPs (Helton y col., 2005). Aquí vemos que el método de sustracción de DHPs puede llevar a error en el análisis de la dependencia del voltaje de los canales  $Ca_v1$ , y proponemos el método de aislamiento de los canales  $Ca_v1$  con el cóctel de bloqueantes de CCDV como una mejor alternativa.

De acuerdo con los datos del experimento de inmunonitoquímica, los canales  $Ca_v1$  que se expresan en las células cromafines humanas son de los subtipos  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ , al igual que vimos en las células cromafines de ratón (Pérez-Alvarez y col., 2011). El potencial de activación relativamente despolarizado obtenido en las células cromafines humanas sugiere una menor contribución de los canales  $Ca_v1.3$  a la corriente total de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, sí que existe cierta participación de estos canales, tal y como sugiere el bloqueo incompleto que producen altas concentraciones de nifedipino (3  $\mu$ M) de la corriente resistente al cóctel de bloqueantes (Xu y Lipscombe, 2001; Lipscombe y col., 2004). Esta corriente resistente al bloqueo por nifedipino y al cóctel de bloqueantes puede ser recuperada completamente al perfundir Bay K 8644.

Los canales  $Ca_v1$  no contribuyen al disparo de los PAs espontáneos en las células cromafines humanas, al contrario de lo que ocurre en células cromafines de ratón (Marcantoni y col., 2010; Pérez-Alvarez y col., 2011). Esta conclusión la hemos obtenido de realizar dos aproximaciones metodológicas. Primero, obteniendo la corriente  $Ca_v1$  por sustracción de la corriente control menos la corriente en presencia de la DHP, llevando a cabo experimentos de "AP-clamp" a  $V_h=-80$  mV y  $V_h=-50$  mV. No se activaba ninguna corriente de tipo  $Ca_v1$  al potencial umbral de disparo. Sin embargo, las DHPs ejercen un bloqueo lento (Helton y col., 2005), y esto podría enmascarar la contribución de los canales al disparo, realizamos los mismos experimentos pero en presencia del cóctel de CCDV para aislar los canales  $Ca_v1$ , y obtuvimos una conclusión similar.

Nuestros datos también muestran que los canales  $Ca_v1$  nativos humanos

pueden activarse en respuesta a PAs simples. Esto se había visto ya en sistemas heterólogos (Helton y col., 2005; Liu y col., 2003), pero no en los sistemas nativos. En el presente estudio esta conclusión la alcanzamos con el método de sustracción de DHPs, y en un grupo diferentes de experimentos, con la aplicación del cóctel de bloqueantes, empleando en ambos casos el protocolo de "AP-clamp". La contribución del canal  $Ca_v1$  a la corriente de  $Ca^{2+}$  máxima obtenida con el método de sustracción de DHPs ( $19.41 \pm 1.8\%$ ,  $n=4$ , *Figura humano 5e-f*) y con el cóctel de compuestos ( $21.42 \pm 4\%$ ,  $n=9$ , *Figura humano 5g*) era idéntica. Así, los canales en las células cromafines humanas contribuyen a la corriente de entrada de  $Ca^{2+}$  durante la estimulación con el PA.

Por otra parte, en estos experimentos vimos que los canales  $Ca_v1$  humanos eran tan eficientes como los no- $Ca_v1$  en mediar la entrada de  $Ca^{2+}$  durante la aplicación de un PA como estímulo. En sistemas heterólogos, los canales  $Ca_v1.3$  han mostrado ser al menos tan eficientes como los canales  $Ca_v2.2$  en este tipo de estimulación, y los canales  $Ca_v1.2$  ligeramente menos eficientes (Helton y col., 2005).

Se ha visto que el efecto de nifedipino era más débil sobre los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  expresados en sistemas heterólogos estimulados con PAs pero no con despolarizaciones, pero a pesar de ello, los canales  $Ca_v1$  pueden ser reclutados empleando como estímulo PAs (Helton y col., 2005). También, los canales  $Ca_v1$  activados con PAs son la mitad que los reclutados con pulsos despolarizantes en neuronas de hipocampo de rata (Mermelstein y col., 2000). Esto implica que la importancia de los canales  $Ca_v1$  a los procesos neuronales evocados por PAs puedan ser subestimados en estudios previos debido al uso del método de sustracción de DHPs (Bonci y col., 1998; Yasuda y col., 2003; Hoogland y Saggau, 2004). Por tanto, la falta de inhibición en neuronas de la entrada de  $Ca^{2+}$  por estos compuestos no excluye necesariamente la implicación de los canales  $Ca_v1$  (Helton y col., 2005).

Sin embargo, aquí hemos visto que nifedipino reduce de manera similar las corrientes de  $Ca^{2+}$  activadas por PAs o por despolarización. Como se mencionaba antes, el bloqueo ejercido por nifedipino empleando el protocolo de "AP-clamp"

era similar al obtenido al dar pulsos despolarizantes, implicando que las DHPs no bloquean lentamente los canales  $Ca_v1$  en las células cromafines humanas nativas. El lento bloqueo de estos fármacos sobre los canales  $Ca_v1$  observado en sistemas heterólogos podría deberse a al tipo de subunidad  $\beta$  asociada y al patrón de procesamiento alternativo (splicing), que podría influenciar las propiedades del canal y a la efectividad de las DHPs (Helton y col., 2005).

Hemos podido ver que en las células cromafines humanas existen los dos tipos de corrientes ( $BK_i$  y  $BK_s$ ) caracterizadas previamente por Solaro y colaboradores en rata (Solaro y col., 1995). Así, en la mitad de las células analizadas encontramos corrientes del tipo inactivante ( $BK_i$ ) y en la otra mitad se observaron corrientes de tipo no inactivante ( $BK_s$ ). En rata el porcentaje de células con corrientes de tipo  $BK_i$  era mucho mayor que el de células con corriente  $BK_s$  (75.8% frente a sólo un 9.2%). Las corrientes  $BK_i$  y  $BK_s$  se ajustaban a una curva exponencial simple o doble, respectivamente, pero la inactivación alcanzada finalmente era similar en ambos tipos de canales BK.

También hemos visto que los canales  $Ca_v1$  están acoplados a los BK en las células cromafines humanas. Los canales  $Ca_v1$  también están acoplados a los canales BK en las células cromafines de ratón (Marcantoni y col., 2010; Pérez-Alvarez y col., 2011), pero la contribución a la activación de los canales BK parece ser incluso mayor en las células humanas respecto a las murinas, hecho sugerido por el gran bloqueo que se obtiene de las corrientes BK con nifedipino en relación a la contribución de los canales  $Ca_v1$  a la corriente total de  $Ca^{2+}$ . En ratón esta contribución es del 45% (Pérez-Alvarez y col., 2011) y del 15% en humano (Pérez-Alvarez y col., 2008; esta tesis). Sin embargo, el bloqueo por nifedipino es similar en ambas especies, alcanzando un  $52.7\pm 7\%$  y un  $46.7\pm 4\%$ , respectivamente, en las células cromafines de ratón y humano, respectivamente.

La exocitosis es también altamente controlada por los canales  $Ca_v1$  en las células cromafines humanas. La aplicación de nifedipino bloqueó la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$  al pico un  $21.37\pm 2.78\%$ , pero el bloqueo de la exocitosis era aproximadamente el doble. Sin embargo, el bloqueo ejercido por nifedipino sobre las corrientes  $Ca_v1$  y la exocitosis va en paralelo cuando se aplican pulsos

despolarizantes en las células cromafines de vaca (Lukyanetz y Neher, 1999; Ulate y col., 2000) o ratón (Aldea y col., 2002; Pérez-Alvarez y col., 2011; Hernández-Vivanco y col., 2012). Esto quiere decir, que en las células cromafines humanas, al contrario que en otras especies, hay una colocación funcional entre los canales  $Ca_v1$  y la maquinaria de exocitosis.

Asimismo pudimos ver que el bloqueo de los canales  $Ca_v1$  por las DHPs aumentaba con el voltaje, tal y como se había visto previamente en otros sistemas celulares (Bean, 1984; Sanguinetti y Kass, 1984), pero el porcentaje de canales  $Ca_v1$  activados es similar a potenciales de fijación hiperpolarizados (-80 mV) y más despolarizados (-50 mV). Esto era en un principio difícil de evaluar empleando las DHPs, debido a su aumento de bloqueo a potenciales despolarizados. Pero gracias al aislamiento de los canales  $Ca_v1$  con el cóctel de bloqueantes de CCDV, pudimos ver que el porcentaje de canales  $Ca_v1$  era similar a -80 mV o a -50 mV. Ni las corrientes control de  $Ca^{2+}$  ni las corrientes  $Ca_v1$  variaban con el voltaje, sugiriendo que los canales  $Ca_v1$  y los no- $Ca_v1$  no se inactivan significativamente por voltaje en las células cromafines humanas.

Finalmente, en nuestro estudio realizamos una comparación entre el bloqueo con dos DHPs ampliamente empleadas (nifedipino e isradipino). Se había descrito que isradipino era unas diez veces más potente que otras DHPs como nimodipino o nitrendipino en sistemas recombinantes (Koschak y col., 2001; Xu and Lipscombe, 2001). En nuestros experimentos, vimos que nifedipino, la DHP empleada a lo largo de nuestro estudio, y de estructura química muy similar a la de nitrendipino, producía el mismo bloqueo que isradipino sobre la densidad de corriente de  $Ca^{2+}$ . Esta diferencia con los sistemas heterólogos puede deberse a la diferente expresión de los canales  $Ca_v1$  entre ambos sistemas.

## **CONCLUSIONES DE LOS EXPERIMENTOS REALIZADOS EN LAS CÉLULAS HUMANAS**

Las principales conclusiones alcanzadas en este estudio son:

1. Los canales  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  son los principales subtipos de canales  $Ca_v1$  expresados en estas células.
2. Los canales  $Ca_v1$  se activan a un potencial ( $V_{threshold}$ ) de  $-14.7$  mV y mostraban un  $V_{1/2}$  de  $3.4$  mV.
3. Los canales  $Ca_v1$  no contribuyen al disparo de PAs espontáneos.
4. Los canales  $Ca_v1$  pueden activarse por PAs simples.
5. Los canales  $Ca_v1$  se abren a una velocidad similar y son tan eficientes como los canales no- $Ca_v1$  en mediar la entrada de  $Ca^{2+}$  cuando se activan empleando como estímulo un PA.
6. Los canales  $Ca_v1$  están altamente acoplados a los canales BK.
7. Los canales  $Ca_v1$  se colocan funcionalmente con la maquinaria de excitación.
8. La contribución relativa de los canales  $Ca_v1$  a la corriente total de  $Ca^{2+}$  es similar a  $V_h=-80$  y  $V_h=-50$  mV.
9. El bloqueo con DHPs aumenta a potenciales más despolarizados.
10. Nifedipino no bloquea lentamente los canales  $Ca_v1$  activados por PAs simples; sin embargo, reduce de forma similar los canales  $Ca_v1$  activados por PAs simples o por despolarización.

**11.** Las DHPs israpipino y nifedipino producen el mismo grado de bloqueo sobre los canales  $Ca_v1$ .

**12.** Para analizar la dependencia del voltaje de estos canales; es preferible la caracterización directa de estos canales es preferible su aislamiento con el cóctel de bloqueantes de CCDV.

Como conclusión general, nuestros datos muestran por primera vez registros electrofisiológicos de corrientes  $Ca_v1$  nativas puras, revelando las propiedades biofísicas y funcionales de estos canales en células cromafines humanas y demostrando características relevantes del efecto de las DHPs sobre los mismos, lo que puede ayudar al mayor entendimiento de la fisiología de estos canales de  $Ca^{2+}$  y de la farmacología de las DHPs. Esta información es bastante difícil de conseguir debido a las dificultades que conlleva la obtención de tejido humano. Nuestros datos también añaden avances metodológicos en relación a la caracterización de la dependencia del voltaje de los canales  $Ca_v1$ .

Finalmente, el presente estudio podría tener implicaciones terapéuticas. Se ha sugerido que la modulación de la dependencia del voltaje de las DHPs puede participar en la selectividad de tejido de estos fármacos, como ocurre en el músculo liso, que son células más despolarizadas por ejemplo que las del miocardio (Nelson y col., 1988; Triggle, 1991). El potencial de activación umbral despolarizado de los canales  $Ca_v1$  de las células cromafines humanas podría explicar el mayor efecto de las DHPs sobre estas células y su contribución al bloqueo de la liberación de adrenalina para controlar situaciones patológicas tales como la hipertensión o las crisis de feocromocitoma. Además, nuestro estudio valida el empleo de las células cromafines humanas como modelo para investigar las propiedades biofísicas y el papel funcional de los canales  $Ca_v1$  neuronales nativos, que han sido poco investigados hasta la fecha debido a la dificultad para obtener tejido humano.



**BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Albillos, A., Abad, F., García, A.G. 1992. Cross-talk between M2 muscarinic and D1 dopamine receptors in the cat adrenal medulla. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 183:1019-1024.
- ✓ Albillos, A., García, A.G., Gandía, L. 1993. omega-Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 336:259-262.
- ✓ Albillos, A., Artalejo, A.R., López, M.G., Gandía, L., García, A.G., Carbone, E. 1994. Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J.Physiol.* 477 (Pt 2):197-213.
- ✓ Albillos, A., Gandía, L., Michelena, P., Gilabert, J.A., del Valle, M., Carbone, E., García, A.G. 1996a. The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 494 (Pt 3):687-695.
- ✓ Albillos, A., Carbone, E., Gandía, L., García, A.G., Pollo, A. 1996b. Opioid inhibition of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur.J.Neurosci.* 8:1561-1570.
- ✓ Albillos A, García AG, Olivera B, Gandía L. 1996c. Re-evaluation of the P/Q Ca<sup>2+</sup> channel components of Ba<sup>2+</sup> currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba<sup>2+</sup> concentrations. *Pflugers Arch* 432:1030-1038.
- ✓ Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G., Lindau, M. 1997. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature.* 389:509-512.
- ✓ Albillos, A., Neher, E., Moser, T. 2000. R-Type Ca<sup>2+</sup> channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J.Neurosci.* 20:8323-8330.

- ✓ Aldea, M., Jun, K., Shin, H.S., Andrés-Mateos, E., Solís-Garrido, L.M., Montiel, C., García, A.G., Albillos, A. 2002. A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and alpha(1A) knockout mice. *J.Neurochem.* 81:911-921.
  
- ✓ Aloe, L., 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.* 76:1246-1250.
  
- ✓ Aniksztejn, L., Ben-Ari, Y. 1991. Novel form of long-term potentiation produced by a K<sup>+</sup> channel blocker in the hippocampus. *Nature.* 349:67–69.
  
- ✓ Anney, R.J., Olsson, C.A., Lotfi-Miri, M., Patton, G.C., Williamson, R. 2004. Nicotine dependence in a prospective population-based study of adolescents: the protective role of a functional tyrosine hydroxylase polymorphism. *Pharmacogenetics.* 14:73-81.
  
- ✓ Aosaki, T., Kasai, H. 1989. Characterization of two kinds of high-voltage-activated calcium-channel currents in chick sensory neurons. differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflüger Arch.* 414:150-156.
  
- ✓ Appel, N.M., Elde, R.P. 1988. The intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord is comprised of target-specific subnuclei: evidence from retrograde transport studies and immunohistochemistry. *J Neurosci.* 8:1767-1775.
  
- ✓ Arjona, V., Mínguez-Castellanos, A., Montoro, R.J., Ortega, A., Escamilla, F., Toledo-Aral, J.J., Pardal, R., Méndez-Ferrer, S., Martín, J.M., Pérez, M., Katati, M.J., Valencia, E., García, T., López-Barneo, J. 2003. Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery.* 53:321-8; discussion 328-30.
  
- ✓ Arroyo, G., Aldea, M., Fuentealba, J., Albillos, A., García, A.G. 2003. SNX482

- selectively blocks P/Q Ca<sup>2+</sup> channels and delays the inactivation of Na<sup>+</sup> channels of chromaffin cells. *Eur.J.Pharmacol.* 475:11-18.
- ✓ Artalejo, C.R., Dahmer, M.K., Perlman, R.L., Fox, A.P. 1991a. Two types of Ca<sup>2+</sup> currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. *J.Physiol.* 432:681-707.
  - ✓ Artalejo, C.R., Mogul, D.J., Perlman, R.L., Fox, A.P. 1991b. Three types of bovine chromaffin cell Ca<sup>2+</sup> channels: facilitation increases the opening probability of a 27 pS channel. *J.Physiol.* 444:213-240.
  - ✓ Artalejo, C.R., Perlman, R.L., Fox, A.P. 1992. Omega-conotoxin GVIA blocks a Ca<sup>2+</sup> current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. *Neuron.* 8:85-95.
  - ✓ Artalejo, A.R., García, A.G., Neher, E. 1993. Small-conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 423:97-103.
  - ✓ Artalejo, C.R., Adams, M.E., Fox, A.P. 1994. Three types of Ca<sup>2+</sup> channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature.* 367:72-76.
  - ✓ Artalejo, C.R., Henley, J.R., McNiven, M.A., Palfrey, H.C.1995. Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca<sup>2+</sup>, GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8328-8332.
  - ✓ Augustine, G.J., Adler, E.M., Charlton, M.P.1991. The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann N Y Acad Sci.* 635:365-381.Rev.
  - ✓ Augustine, G.J., Neher, E.1992.Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells.*J Physiol.* 450:247-271.
  - ✓ Aunis, D., Langle, K. 1999. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol.Scand.* 167:89-97.

- ✓ Backlund, E.O., Granberg, P.O., Hamberger, B., Knutsson, E., Mårtensson, A., Sedvall, G., Seiger, A., Olson, L. 1985. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J.Neurosurg.* 62:169-173.
- ✓ Barbara, J.G., Takeda, K. 1996. Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:9905-9909.
- ✓ Barbara, J.G., Poncer, J.C., McKinney, R.A., Takeda, K. 1998. An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J.Neurosci.Methods.* 80:181-189.
- ✓ Barbeau P, Litaker MS, Jackson RW, Treiber FA. A tyrosine hydroxylase microsatellite and hemodynamic response to stress in a multi-ethnic sample of youth. *Ethn Dis.* 2003 Spring;13(2):186-92.
- ✓ Bean, B.P. 1984. Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:6388-6392.
- ✓ Bean, B.P. 2007. The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci.* 8:451-465.
- ✓ Bech-Hansen, N.T., Naylor, M.J., Maybaum, T.A., Pearce, W.G., Koop, B., Fishman, G.A., Mets, M., Musarella, M.A., Boycott, K.M. 1998. Loss-of-function mutations in a calcium-channel  $\alpha$ 1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 19:264-267.
- ✓ Bernatchez, G., Talwar, D., Parent, L. 1998. Mutations in the EF-hand motif impair the inactivation of barium currents of the cardiac  $\alpha$ 1C channel. *Biophys. J.* 75:1727-1739.
- ✓ Biales, B., Dichter, M., Tischler, A. 1976. Electrical excitability of cultured

adrenal chromaffin cells. *J.Physiol.* 262:743-753.

- ✓ Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stuhmer, W., Flockerzi, V., Hofmann, F. 1990. Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett.* 269:409-412
- ✓ Bilodeau, M.L., Boulineau, T., Hullinger, R.L., Andrisani, O.M. 2000. Cyclic AMP signaling functions as a bimodal switch in sympathoadrenal cell development incultured primary neural crest cells. *Mol Cell Biol* 20:3004–301.
- ✓ Bilodeau, M.L., Ji, M., Paris, M., Andrisani, O.M. 2005. Adenosine signaling promotes neuronal, catecholaminergic differentiation of primary neural crest cells and CNS-derived CAD cells. *Mol Cell Neurosci* 29:394–404.
- ✓ Bishop, D.L., Milton, R.L. 1998. Nimodipine suppresses preferential reinnervation of mouse soleus muscles by slow alpha-motoneurons. *Exp Neurol.* 154:366–370.
- ✓ Boland, M.L., Morrill, J. A., Bean, B.P. 1994. omega-conotoxin block of N-type calcium channels in frog and rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 14:5011-5027.
- ✓ Bonci, A., Grillner, P., Mercuri, N.B., Bernardi, G. 1998. L-type calcium channels mediate a slow excitatory synaptic transmission in rat midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 18: 6693-6703.
- ✓ Bormann, J., Clapham, D.E. 1985. gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82:2168-2172.
- ✓ Bossu, J.L., Feltz, A., Thomann, J.M. 1985. Depolarization elicits two distinct calcium currents in vertebrate sensory neurones. *Pflügers Arch.* 403:360-368.
- ✓ Bossu, J.L.; De Waards, M., Feltz, A. 1991. Two types of calcium channels are

- expressed in adult bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 437:621-634.
- ✓ Bournaud, R., Hidalgo, J., Yu, H., Jaimovich, E., Shimahara, T. 2001. Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J.Physiol.* 537:35-44.
  - ✓ Brandt, A., Striessnig, J., Moser, T. 2003. Cav1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci.* 23:10832-10840.
  - ✓ Brandt, B.L., Hagiwara, S., Kidokoro, Y., Miyazaki, S. 1976. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J.Physiol.* 263:417-439.
  - ✓ Brehm, P., Eckert, R. 1978. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in *Paramecium*. *Science* 202:1203-1206.
  - ✓ Brosenitsch, T.A., Salgado-Commissariat, D., Kunze, D.L., Katz, D.M. 1998. A role for L-type calcium channels in developmental regulation of transmitter phenotype in primary sensory neurons. *J Neurosci.* 18:1047-1055.
  - ✓ Burgoyne, R.D., Morgan, A. 2003. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* 83:581-632. Rev.
  - ✓ Carabelli, V., Carra, I., Carbone, E. 1998. Localized secretion of ATP and opioids revealed through single Ca<sup>2+</sup> channel modulation in bovine chromaffin cells. *Neuron.* 20:1255-1268.
  - ✓ Carabelli, V., Giaccipoli, A., Baldelli, P., Carbone, E., Artalejo, A.R. 2003. Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys.J.* 85:1326-1337.
  - ✓ Carabelli, V., Hernández-Guijo, J.M., Baldelli, P., Carbone, E. 2001. Direct autocrine inhibition and cAMP-dependent potentiation of single L-type Ca<sup>2+</sup> channels in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 532:73-90.

- ✓ Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., de Luca, A., Diaz, J., Borges, R., Carbone, E. 2007. Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J.Physiol.* 584:149-165.
- ✓ Carbone, E., Giaccipoli, A., Marcantoni, A., Guido, D., Carabelli, V. 2006. A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium.* 40:147-154. Rev.
- ✓ Carbone, E., Lux, H.D. 1984. A low voltage activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-511.
- ✓ Catterall, W.A., Striessnig, J. 1992. Receptor sites for Ca<sup>2+</sup> channel antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:256-262.
- ✓ Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:521-555. Rev.
- ✓ Catterall, W.A., Goldin, A.L., Waxman, S.G. 2005a. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev.* 57:397-409. Rev.
- ✓ Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, T.P., Striessnig, J. 2005b. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57:411-425. Rev.
- ✓ Cavadas, C., Grand, D., Mosimann, F., Cotrim, M.D., Fontes Ribeiro, C.A., Brunner, H.R., Grouzmann, E. 2003. Angiotensin II mediates catecholamine and neuropeptide Y secretion in human adrenal chromaffin cells through the AT1 receptor. *Regul Pept.* 111:61-65.
- ✓ Cavadas, C., Silva, A.P., Mosimann, F., Cotrim, M.D., Ribeiro, C.A., Brunner,



- H.R., Grouzmann, E. 2001. NPY regulates catecholamine secretion from human adrenal chromaffin cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 86:5956-5963.
- ✓ Ceña, V., Nicolas, G.P., Sanchez-García, P., Kirpekar, S.M., García, A.G. 1983. Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience.* 10:1455-1462.
  - ✓ Cesetti, T., Hernández-Guijo, J.M., Baldelli, P., Carabelli, V., Carbone, E. 2003. Opposite action of beta1- and beta2-adrenergic receptors on Ca(V)1 L-channel current in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 23:73-83.
  - ✓ Chan, C.S., Guzman, J.N., Ilijic, E., Mercer, J.N., Rick, C., Tkatch, T., Meredith, G.E., Surmeier, D.J. 2007. 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* 447:1081-1086.
  - ✓ Chow, R.H., von Ruden, L., Neher, E. 1992. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature.* 356:60-63.
  - ✓ Chow, R.H., Klingauf, J., Neher, E. 1994. Time course of Ca<sup>2+</sup> concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:12765-12769.
  - ✓ Chung, K.F., Sicard, F., Vukicevic, V., Hermann, A., Storch, A., Huttner, W.B., Bornstein, S.R., Ehrhart-Bornstein, M. 2009. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla. *Stem Cells.* 27:2602-2613.
  - ✓ Cigola, E., Volpe, B.T., Lee, J.W., Franzen, L., Baker, H. 1998. Tyrosine hydroxylase expression in primary cultures of olfactory bulb: role of L-type calcium channels. *J Neurosci.* 18:7638-7649.
  - ✓ Coupland, R.E., Hopwood, D. 1966. The mechanism of the differential staining reaction for adrenaline-and noreadrenaline-storing granules in tissues fixed in

glutaraldehyde. *J.Anat.* 100:227-243.

- ✓ Coupland, R.E. 1989. The natural history of the chromaffin cell--twenty-five years on the beginning. *Arch.Histol.Cytol.* 52 Suppl:331-341.
- ✓ Cox, D.H., Dunlap, K. 1994. Inactivation of N-type calcium current in chick sensory neurons: calcium and voltage dependence. *J. Gen. Physiol.* 104: 311-336.
- ✓ Crowder, R.E. 1957. The development of the adrenal gland in man, with special reference to origin and ultimate location of cell types and evidence in favour of the 'cell migration' theory. En *Contributions to Embryology.* Carnegie Institution of Washington Publication 611. 193-210.
- ✓ Cryer, P.E. 1980. Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *N.Engl.J.Med.* 303:436-444.
- ✓ Cubells, J.F., Zabetian, C.P. 2004. Human genetics of plasma dopamine beta-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology (Berl).* 174:463-476. Rev.
- ✓ Cui, J., Zhou, X., Chazaro, I., DeStefano, A.L., Manolis, A.J., Baldwin, C.T., Gavras, H. 2003. Association of polymorphisms in the promoter region of the PNMT gene with essential hypertension in African Americans but not in whites. *Am J Hypertens.* 16:859-863.
- ✓ Date, I., Felten, S.Y., Felten, D.L. 1990. Cografts of adrenal medulla with peripheral nerve enhance the survivability of transplanted adrenal chromaffin cells and recovery of the host nigrostriatal dopaminergic system in MPTP-treated young adult mice. *Brain Res.* 537:33-39.
- ✓ Date, I. 1996. Parkinson's disease, trophic factors, and adrenal medullary chromaffin cell grafting: basic and clinical studies. *Brain Res.Bull.* 40:1-19.

- 
- ✓ Davies, J.N., Zamponi, G.W. 2008. Old proteins, developing roles: The regulation of calcium channels by synaptic proteins. *Channels (Austin)*. 2:130-138. Rev.
  - ✓ De Leon, M., Wang, Y. 1995. Essential Ca<sup>2+</sup>-binding motif for Ca<sup>2+</sup>-sensitive inactivation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science*. 270: 1502-1506.
  - ✓ Del Toro, R., Levitsky, K.L., López-Barneo, J., Chiara, M.D. 2003. Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia. *J Biol Chem*. 278:22316-22324.
  - ✓ Di Angelantonio, S., Costa, V., Carloni, P., Messori, L., Nistri, A. 2002. A novel class of peptides with facilitating action on neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells in vitro: functional and molecular dynamics studies. *Mol.Pharmacol*. 61:43-54.
  - ✓ Ding, Y.J., Zhang, W.C., Jiao, S.S., Cao, J.K., Meng, J.M., Ding, M.C., Sun, J.B., Zhang, Z.M., Shi, M.T. 1988. Functional improvement by transplanting auto-adrenal medulla grafts into caudate in patients with parkinsonism. *Chin.Med.J.(Engl)*. 101:631-636.
  - ✓ Diverse-Pierluissi, M., Dunlap, K., Westhead, E.W. 1991. Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 88:1261-1265.
  - ✓ Doering, C.J., Zamponi, G.W. 2003. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*. 35:491-505. Rev.
  - ✓ Dolphin, A.C., Scott, R.H. 1987. Calcium channel currents and their inhibition by (-)-baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J.Physiol*. 386:1-17.
  - ✓ Douglas, W.W., Rubin, R.P. 1961. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J.Physiol*. 159:40-57.

- ✓ Douglas, W.W., Poisner, A.M. 1965. Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature*. 208:1102-1103.
- ✓ Drucker-Colin, R., Madrazo, I., Ostrosky-Solis, F., Shkurovich, M., Franco, R., Torres, C. 1988. Adrenal medullary tissue transplants in the caudate nucleus of Parkinson's patients. *Prog. Brain Res.* 78:567-574.
- ✓ Drucker-Colin, R., Verdugo-Diaz, L. 2004. Cell transplantation for Parkinson's disease: present status. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24:301-316.
- ✓ Dubel, S.J., Starr, T.V., Hell, J., Ahljianian, M.K., Enyeart, J.J., Catterall, W.A., Snutch, T.P. 1992. Molecular cloning of the  $\alpha$ -1 subunit of an  $\omega$ -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 5058-5062.
- ✓ Eaton, M.J., Frydel, B.R., López, T.L., Nie, X.T., Huang, J., McKillop, J., Sagen, J. 2000. Generation and initial characterization of conditionally immortalized chromaffin cells. *J. Cell. Biochem.* 79:38-57.
- ✓ Eaton, M.J., Duplan, H. 2004. Useful cell lines derived from the adrenal medulla. *Mol Cell Endocrinol.* 228:39-52. Rev.
- ✓ Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R. W., Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25:533-535.
- ✓ Espejo, E.F., Montoro, R.J., Armengol, J.A., López-Barneo, J. 1998. Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron.* 20:197-206.
- ✓ Espejo, E.F., Gonzalez-Albo, M.C., Moraes, J.P., El Banoua, F., Flores, J.A., Caraballo, I. 2001. Functional regeneration in a rat Parkinson's model after intrastriatal grafts of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming

growth factor beta1-expressing extra-adrenal chromaffin cells of the Zuckerkandl's organ. *J.Neurosci.* 21:9888-9895.

- ✓ Faber, E.S., Sah, P. 2002. Physiological role of calcium-activated potassium currents in the rat lateral amygdala. *J Neurosci.* 22: 1618–1628.
- ✓ Faber, E.S., Sah, P. 2003. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel inactivation contributes to spike broadening during repetitive firing in the rat lateral amygdala. *J Physiol.* 552: 483–497.
- ✓ Fedulova SA, Kostyuk PG, Veselovsky NS.1985. Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 359:431-446.
- ✓ Feldberg, W., Minz, B., Tsudzimura, H. 1934. The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J.Physiol.* 81:286-304.
- ✓ Fenwick, E.M., Marty, A., Neher, E. 1982a. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J.Physiol.* 331:577-597.
- ✓ Fenwick, E.M., Marty, A., Neher, E. 1982b. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 331:599-635.
- ✓ Fernandez-Espejo, E., Armengol, J.A., Flores, J.A., Galan-Rodriguez, B., Ramiro, S. 2005. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 49:343-354.
- ✓ Flucher, B.E., Franzini-Armstrong, C. 1996. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:8101–8106.
- ✓ Fox, A.P., Nowycky, M.C., Tsien, R.W. 1987a. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory

- neurones. *J.Physiol.* 394:149-172.
- ✓ Fox, A.P., Nowycky, M.C., Tsien, R.W. 1987b. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J.Physiol.* 394:173-200.
  - ✓ Freed, W.J., Morihisa, J.M., Spoor, E., Hoffer, B.J., Olson, L., Seiger, A., Wyatt, R.J. 1981. Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature.* 292:351-352.
  - ✓ Fujita, H., Tanizawa, Y., Hiura, H. 1976. Ontogenesis of granule formation in adrenal chromaffin cells of the chick. *En Chromaffin, Enterochromaffin and Related Cells.* Elsevier, Amsterdam. 1-12.
  - ✓ Gandía, L., García, A.G., Morad, M. 1993. ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J.Physiol.* 470:55-72.
  - ✓ Gandía, L., Borges, R., Albillos, A., García, A.G. 1995. Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 430:55-63.
  - ✓ Gandía, L., Lara, B., Imperial, J.S., Villarroya, M., Albillos, A., Maroto, R., García, A.G., Olivera, B.M. 1997. Analogies and differences between omega-conotoxins MVIIC and MVIID: binding sites and functions in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 435:55-64.
  - ✓ Gandía, L., Mayorgas, I., Michelena, P., Cuchillo, I., de Pascual, R., Abad, F., Novalbos, J.M., Larrañaga, E., García, A.G. 1998. Human adrenal chromaffin cell calcium channels: drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflugers Arch.* 436:696-704.
  - ✓ Ganitkevich, V., Shuba, M.F., Smirnov, S.V. 1986. Potential-dependent calcium inward current in a single isolated smooth muscle cell of the guinea-pig taenia caeci. *J.Physiol.* 380:1-16.

- ✓ García, A.G., Sala, F., Reig, J.A., Viniestra, S., Frias, J., Fonteriz, R., Gandía, L. 1984. Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature*. 309:69-71.
- ✓ García, A.G., García-De-Diego, A.M., Gandía, L., Borges, R., García-Sancho, J. 2006. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol.Rev.* 86:1093-1131.
- ✓ García-Palomero, E., Cuchillo-Ibanez, I., García, A.G., Renart, J., Albillos, A., Montiel, C. 2000. Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca<sup>2+</sup> channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett.* 481:235-239.
- ✓ García-Palomero, E., Renart, J., Andres-Mateos, E., Solis-Garrido, L.M., Matute, C., Herrero, C.J., García, A.G., Montiel, C. 2001. Differential expression of calcium channel subtypes in the bovine adrenal medulla. *Neuroendocrinology*. 74:251-261.
- ✓ Gasparini, S., Kasyanov, A.M., Pietrobon, D., Voronin, L.L., Cherubini, E. 2001. Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus. *J.Neurosci.* 21:8715-8721.
- ✓ Gerber, S.H., Südhof, T.C. 2002. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*. 51 Suppl 1:S3-11. Rev.
- ✓ Giancippoli, A., Novara, M., de Luca, A., Baldelli, P., Marcantoni, A., Carbone, E., Carabelli, V. 2006. Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys.J.* 90:1830-1841.
- ✓ Gillis, K.D., Pun, R.Y., Mislner, S. 1991. Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch.* 418: 611-613.
- ✓ Gillis, K.D., Mossner, R., Neher, E. 1996. Protein kinase C enhances exocytosis from chromaffin cells by increasing the size of the readily

releasable pool of secretory granules. *Neuron*. 16:1209-1220.

- ✓ Glossmann, H., Striessnig, J. 1990. Molecular properties of calcium channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 114:1-105.
- ✓ Goldberg, J.A., Wilson, C.J. 2005. Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci.* 25: 10230–10238.
- ✓ González-García, C., Ceña, V., Keiser, H.R., Rojas, E. 1993. Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta.* 1177:99-105.
- ✓ Gorgas, K., Bock, P. 1976. Morphology and histochemistry of the adrenal medulla. I. Various types of primary catecholamine-storing cells in the mouse adrenal medulla. *Histochemistry.* 50:17-31.
- ✓ Graef, I.A., Mermelstein, P.G., Stankunas, K., Neilson, J.R., Deisseroth, K., Tsien, R.W., Crabtree, G.R. 1999. L-type calcium channels and GSK-3 regulate NF-ATc4 activity in hippocampal neurons. *Nature.* 401:703–708.
- ✓ Grantham, C.J., Main, M.J., Cannell, M.B. 1994. Fluspirilene block of N-type calcium current in NGF-differentiated PC 12 cells. *Br. J. Pharmacol.* 111:483-488.
- ✓ Hagiwara, S., Ozawa, S., Sand, O. 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 65: 617-644.
- ✓ Hagiwara, N., Irisawa, H., Kameyama, M. 1988. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 395:233-253.
- ✓ Hama, A.T., Sagen, J. 1994. Alleviation of neuropathic pain symptoms by



- xenogeneic chromaffin cell grafts in the spinal subarachnoid space. *Brain Res.* 651:183-193.
- ✓ Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. 1981. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Pflugers Arch.* 391: 85-100.
  - ✓ Hans, M., Illes, P., Takeda, K. 1990. The blocking effects of omega-conotoxin on Ca current in bovine chromaffin cells. *Neurosci Lett.* 114:63-68.
  - ✓ Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E., Matthews, G. 1994. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature.* 371:513-515.
  - ✓ Heinemann, C., von Ruden, L., Chow, R.H., Neher, E. 1993. A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Arch.* 424:105-112.
  - ✓ Heinemann C, Chow RH, Neher E, Zucker RS. 1994. Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca<sup>2+</sup>. *Biophys J.* 67:2546-2557.
  - ✓ Hell, J.W., Westenbroek, R.E., Warner, C., Ahljianian, M.K., Prystay, W., Gilbert, M.M., Snutch, T.P., Catterall, W.A. 1993. Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol.*123:949-962.
  - ✓ Helton, T.D., Xu, W., Lipscombe, D. 2005. Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly. *J Neurosci.* 25:10247-10251.
  - ✓ Hernández-Guijo, J.M., de Pascual, R., García, A.G., Gandía, L. 1998. Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflugers Arch.* 436:75-82.
  - ✓ Hernández-Vivanco, A., Pérez-Alvarez, A., Caba-González, J.C., Alonso,

- M.T., Moreno-Ortega, A.J., Cano-Abad, M., Ruiz-Nuño, A., Carmona-Hidalgo, B., Albillos, A. 2012. Selectivity of action of pregabalin on Ca(2+) channels but not on fusion pore, exocytotic machinery, or mitochondria in chromaffin cells of the adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther.* 342:263-272.
- ✓ Hernández, A., Segura-Chama, P., Jiménez, N., García, A.G., Hernández-Guijo, J.M., Hernández-Cruz, A. 2011. Modulation by endogenously released ATP and opioids of chromaffin cell calcium channels in mouse adrenal slices. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300:C610-23.
  - ✓ Herrington, J., Park, Y.B., Babcock, D.F., Hille, B. 1996. Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca<sup>2+</sup> loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron.* 16:219-228.
  - ✓ Hescheler, J., Pelzer, D., Trube, G., Trautwein, W. 1982. Does the organic calcium channel blocker D600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane? *Pflügers Arch.* 393:287-291.
  - ✓ Hillarp, N.A. 1946. Functional organization of the peripheral autonomic innervation. *Acta Anat.(Basel).* 4:Suppl., 1.
  - ✓ Hillman, D., Chen, S., Aung, T.T., Cherksey, B., Sugimori, M., Llinás, R.R. 1991. Localization of P-type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7076-7080.
  - ✓ Hillyard, D.R., Monje, V.D., Mintz, I.M., Bean, B.P., Nadasdi, L., Ramachandran, J., Miljanich, G., Azimi-Zoonooz, A., McIntosh, J.M., Cruz, L.J. 1992. A new Conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron.* 9:69-77.
  - ✓ Hirano T. 1982. Neural regulation of adrenal chromaffin cell function in the mouse--stress effect on the distribution of [3H] dopamine in denervated adrenal medulla. *Brain Res* 22:45-54.

- ✓ Hockerman, G.H., Peterson, B.Z., Johnson, B.D., Catterall, W.A. 1997. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 37:361-396.
- ✓ Hofmann, F., Lacinova, L., Klugbauer, N. 1999. Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol.* 139:33-87.
- ✓ Holets, V., Elde, R. 1982. The differential distribution and relationship of serotonergic and peptidergic fibers to sympathoadrenal neurons in the intermediolateral cell column of the rat: a combined retrograde axonal transport and immunofluorescence study. *Neuroscience.* 7:1155-1174.
- ✓ Holgert, H., Aman, K., Cozzari, C., Hartman, B.K., Brimijoin, S., Emson, P., Goldstein, M., Hökfelt, T. 1995. The cholinergic innervation of the adrenal gland and its relation to enkephalin and nitric oxide synthase. *Neuroreport.* 6:2576-2580.
- ✓ Hollins, B., Ikeda, S.R. 1996. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurophysiol.* 76:1195-1211.
- ✓ Holman, M.E., Coleman, H.A., Tonta, M.A., Parkington, H.C. 1994. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *J.Physiol.* 478 (Pt 1):115-124.
- ✓ Holman, M.E., Tonta, M.A., Coleman, H.A., Parkington, H.C. 1995. Currents caused by the spontaneous release of quanta of acetylcholine onto chromaffin cells in guinea-pig adrenal medulla. *Neurosci.Lett.* 184:75-78.
- ✓ Hoogland, T.M., Saggau, P. 2004. Facilitation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in dendritic spines by activation of  $\beta$ 2 adrenergic receptors. *J Neurosci.* 24: 8416-8427.
- ✓ Hoshi, T., Rothlein, J., Smith, S.J. 1984. Facilitation of Ca<sup>2+</sup>-channel currents

in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 81:5871-5875.

- ✓ Hoshi, T., Smith, S.J. 1987. Large depolarization induces long openings of voltage-dependent calcium channels in adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 7:571-580.
- ✓ Iijima, T., Matsumoto, G., Kidokoro, Y. 1992. Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience.* 51:211-219.
- ✓ Ikeda, K., Saito, Y., Nishiyama, A., Takasaka, T. 1991. Effects of pH on intracellular calcium levels in isolated cochlear outer hair cells of guinea pigs. *Am.J.Physiol.* 261:C231-6.
- ✓ Ikeda, S.R. 1991. Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J.Physiol.* 439:181-214.
- ✓ Inoue, M., Imanaga, I. 1993. G protein-mediated inhibition of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in guinea pig chromaffin cells. *Am.J.Physiol.* 265:C946-56.
- ✓ Jackson, A.C., Yao, G.L., Bean, B.P. 2004. Mechanism of spontaneous firing in dorsomedial suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci.* 24: 7985–7998.
- ✓ Jarvis, S.E., Barr, W., Feng, Z.P., Hamid, J., Zamponi, G.W. 2002. Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels. *J Biol Chem.* 277:44399-44407.
- ✓ Jenerick, H. 1963. Phase plane trajectories of the muscle spike potential. *Biophys J.* 3:363-377.
- ✓ Jiao, S.S., Zhang, W.C., Cao, J.K., Zhang, Z.M., Wang, H., Ding, M.C., Zhang, Z., Sun, J.B., Sun, Y.C., Shi, M.T. 1988. Study of adrenal medullary tissue transplantation to striatum in parkinsonism. *Prog.Brain Res.* 78:575-580.

- ✓ Johnson, B.D., Byerly, L. 1994. Ca<sup>2+</sup> channel Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation in a mammalian central neuron involves the cytoskeleton. *Pflügers Arch.* 429:14-21.
- ✓ Jouvenceau, A., Giovannini, F., Bath, C.P., Trotman, E., Sher, E. 2000. Inactivation properties of human recombinant class E calcium channels. *J. Neurophysiol.* 83: 671-684.
- ✓ Jozan, S., Aziza, J., Châtelin, S., Evra, C., Courtade-Saïdi, M., Parant, O., Sol, J.C., Zhou, H., Lazorthes, Y. 2007. Human fetal chromaffin cells: a potential tool for cell pain therapy. *Exp.Neurol.* 205:525-535.
- ✓ Jun, K., Piedras-Rentería, E.S., Smith, S.M., Wheeler, D.B., Lee, S.B., Lee, T.G., Chin, H., Adams, M.E., Scheller, R.H., Tsien, R.W., Shin, H.S.1999. Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:15245-15250.
- ✓ Kajiwara, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M.E., Iijima, T. 1997. Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn.J.Physiol.* 47:449-464.
- ✓ Kalasz, H., Watanabe, T., Yabana, H., Itagaki, K., Naito, K., Nakayama, H., Schwartz, A., Vaghy, P.L. 1993. Identification of 1,4-dihydropyridine binding domains within the primary structure of the  $\alpha$ 1 subunit of the skeletal muscle L-type calcium channel. *FEBS Lett.* 331: 177-181.
- ✓ Kanno, T. 1998. Intra- and intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling in paraneurons and other secretory cells. *Jpn.J.Physiol.* 48:219-227.
- ✓ Kasai, H., Aosaki, T., Fukuda, J. 1987. Presynaptic Ca-antagonist omega-conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons. *Neurosci Res.* 4:228-235.

- ✓ Kerr, L.M., Yoshikami, D. 1984. A venom peptide with a novel presynaptic blocking action. *Nature*. 308:282-284.
- ✓ Kidokoro, Y., Ritchie, A.K., Hagiwara, S. 1979. Effect of tetrodotoxin on adrenaline secretion in the perfused rat adrenal medulla. *Nature*.278:63-65.
- ✓ Kidokoro, Y., Ritchie, A.K. 1980. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J.Physiol*. 307:199-216.
- ✓ Kidokoro, Y., Miyazaki, S., Ozawa, S. 1982. Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J.Physiol*. 324:203-220.
- ✓ Kirpekar, S.M., Prat, J.C. 1979. Release of catecholamines from perfused cat adrenal gland by veratridine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:2081-2083.
- ✓ Kitamura, N., Ohta, T., Ito, S., Nakazato, Y.1997. Calcium channel subtypes in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 434:179-187.
- ✓ Kitamura, N., Ohta, T., Ito, S., Nakazato, Y. 1998. Calcium channel current facilitation in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 435:781-788.
- ✓ Kobayashi, S. 1977. Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Arch Histol Jpn*. 40 Suppl:61-79.
- ✓ Korn, S.J., Horn, R. 1989. Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium- dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J Gen Physiol*. 94:789–812.
- ✓ Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J., Striessnig, J. 2001. alpha 1D (Cav1.3) subunits can form I-type Ca<sup>2+</sup> channels

activating at negative voltages. *J Biol Chem.* 276:22100-22106.

- ✓ Kriegstein, K., Deimling, F., Suter-Crazzolaro, C., Unsicker, K. 1996. Expression and localization of GDNF in developing and adult adrenal chromaffin cells. *Cell Tissue Res.* 286:263-268.
- ✓ Kuniyasu, A., Itagaki, K., Shibano, T., Iino, M., Kraft, G., Schwartz, A., Nakayama, H. 1998. Photochemical identification of transmembrane segment IVS6 as the binding region of semotiadil a new modulator for the L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel. *J. Biol. Chem.* 273:4635-4641.
- ✓ Lara, B., Zapater, P., Montiel, C., de la Fuente, M.T., Martínez-Sierra, R., Ballesta, J.J., Gandía, L., García, A.G. 1995. Density of apamin-sensitive Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels in bovine chromaffin cells: relevance to secretion. *Biochem Pharmacol.* 49:1459-1468.
- ✓ Lazorthes, Y., Sallerin, B., Verdier, J.C., Sol, J.C., Duplan, H., Tkaczuk, J., Tafani, M., Bastide, R., Bes, J.C. 2000. Management of intractable cancer pain: from intrathecal morphine to cell allograft. *Neurochirurgie.* 46:454-465. Rev.
- ✓ Lee, A., Wong, S.T., Gallagher, D., Li, B., Storm, D.R., Scheuer, T., Catterall, W.A. 1999. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* 399: 155-159.
- ✓ Lee, A., Scheuer, T., Catterall, W.A. 2000. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent facilitation and inactivation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Neurosci.* 20: 6830-6838.
- ✓ Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klöckner, U., Schneider, T., Perez-Reyes, E. 1999. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci.* 19: 1912-1921.

- ✓ Levi-Montalcini, R., Aloe, L. 1980. Tropic, trophic, and transforming effects of nerve growth factor. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 25:3-15.
- ✓ Levitsky, K.L., López-Barneo, J. 2009. Developmental change of T-type Ca<sup>2+</sup> channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *J Physiol.* 587(Pt 9):1917-1929.
- ✓ Liévano, A., Santi, C.M., Serrano, C.J., Treviño, C.L., Bellvé, A.R., Hernández-Cruz, A., Darszon, A.1996. T-type Ca<sup>2+</sup> channels and alpha1E expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction. *FEBS Lett.* 388:150-154.
- ✓ Ligon, B., Boyd, A.E. 3rd, Dunlap, K.1998. Class A calcium channel variants in pancreatic islets and their role in insulin secretion. *J.Biol.Chem.* 273:13905-13911.
- ✓ Lindau, M., Fernandez, J.M. 1986. IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature.* 319:150-153.
- ✓ Lindau, M., Neher, E. 1988. Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. *Pflugers Arch.* 411:137-146.
- ✓ Lindvall, O., Backlund, E.O., Farde, L., Sedvall, G., Freedman, R., Hoffer, B., Nobin, A., Seiger, A., Olson, L.1987. Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann.Neurol.* 22:457-468.
- ✓ Linnoila, R.I., Diaugustine, R.P., Hervonen, A., Miller, R.J. 1980. Distribution of [Met<sup>5</sup>]- and [Leu<sup>5</sup>]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience.* 5:2247-2259.
- ✓ Lipscombe, D., Helton, T.D., Xu, W. 2004. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol,* 92:2633-2641.



- ✓ Liu, L., Gonzalez, P.K., Barrett, C.F., Rittenhouse, A.R. 2003. The calcium channel ligand FPL 64176 enhances L-type but inhibits N-type neuronal calcium currents. *Neuropharmacology*. 45:281-292.
- ✓ Liu, Z., Ren, J., Murphy, T.H. 2003. Decoding of synaptic voltage waveforms by specific classes of recombinant high-threshold Ca<sup>2+</sup> channels. *J Physiol*. 553:473-488.
- ✓ Livett, B.G. 1984. Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol.Rev.* 64:1103-1161.
- ✓ Llinas, R., Yarom, Y. 1981. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol*. 315:549-567.
- ✓ Llinás, R., Yarom, Y. 1986. Specific blockade of the low threshold calcium channel by high molecular weight alcohols. *Soc. Neurosci. Abstr.* 12, 174.
- ✓ Llinás, R., Sugimori, M., Lin, J.W., Cherksey, B. 1989a. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:1689-1693.
- ✓ Llinás, R., Sugimori, M., Cherksey, B. 1989b. Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 560:103-111.
- ✓ López, M.G., Villarroja, M., Lara, B., Martínez Sierra, R., Albillos, A., García, A.G., Gandía, L. 1994a. Q- and L-type Ca<sup>2+</sup> channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Len.* 349:331-337.
- ✓ López, M.G., Albillos, A., de la Fuente, M.T., Borges, R., Gandía, L., Carbone, E., García, A.G., Artalejo, A.R. 1994b. Localized L-type calcium channels

control exocytosis in cat chromaffin cells. *Pflügers Arch.* 427: 348-354.

- ✓ López-Lozano, J.J., Brera, B., Abascal, J., Bravo, G. 1989. Preparation of adrenal medullary tissue for transplantation in Parkinson's disease: a new procedure. Technical note. *J.Neurosurg.* 71:452-454.
- ✓ López-Lozano, J.J., Bravo, G., Abascal, J., Brera, B., Pascual, M.L., Martínez, R., de la Torre, C., Moreno, R. 1996. Clinical experience with cotransplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in patients with Parkinson's disease. *Transpl.Int.* 9 Suppl 1:S485-91.
- ✓ López-Lozano, J.J., Bravo, G., Brera, B., Dargallo, J., Salmean, J., Uria, J., Insausti, J., Martinez, R., Sanchez, P., de la Torre, C., Moreno, R. 1997a. Regression of parkinsonian fetal ventral mesencephalon grafts upon withdrawal of cyclosporine A immunosuppression. The CPH Neural Transplantation Group. *Transplant.Proc.* 29:977-980.
- ✓ López-Lozano, J.J., Bravo, G., Brera, B., Millán, I., Dargallo, J., Salmeán, J., Uría, J., Insausti, J. 1997b. Long-term improvement in patients with severe Parkinson's disease after implantation of fetal ventral mesencephalic tissue in a cavity of the caudate nucleus: 5-year follow up in 10 patients. *Clinica Puerta de Hierro Neural Transplantation Group. J.Neurosurg.* 86:931-942.
- ✓ López-Lozano, J.J., Bravo, G., Abascal, J., Brera, B., Millan, I. 1999. Clinical outcome of cotransplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in patients with Parkinson's disease. *Clinica Puerta de Hierro Neural Transplantation Group. J.Neurosurg.* 90:875-882.
- ✓ Lukyanetz, E.A., Neher, E. 1999. Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci.* 11: 2865-2873.
- ✓ Madrazo, I., Drucker-Colín, R., Díaz, V., Martínez-Mata, J., Torres, C., Becerril, J.J. 1987. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease.

N.Engl.J.Med. 316:831-834.

- ✓ Malhotra, R.K., Wakade, A.R. 1987. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the secretion of catecholamines from the rat adrenal gland. *J.Physiol.* 388:285-294.
- ✓ Mangoni, M.E., Couette, B., Bourinet, E., Platzter, J., Reimer, D., Striessnig, J. Nargeot, J. 2003. Functional role of L-type Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:5543-5548.
- ✓ Mann, M.B., Wu, S., Rostamkhani, M., Tourtellotte, W., MacMurray, J.P., Comings, D.E. 2002. Association between the phenylethanolamine N-methyltransferase gene and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 124:101-105.
- ✓ Marcantoni A, Carabelli V, Comunanza V, Hoddah H, Carbone E. 2008. Calcium channels in chromaffin cells: focus on L and T types. *Acta Physiol (Oxf).* 192:233-246. Rev.
- ✓ Marcantoni, A., Carabelli, V., Vandael, D.H., Comunanza, V., Carbone, E. 2009. PDE type-4 inhibition increases L-type Ca<sup>(2+)</sup> currents, action potential firing, and quantal size of exocytosis in mouse chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 457:1093-1110.
- ✓ Marcantoni, A., Vandael, D.H., Mahapatra, S., Carabelli, V., Sinnegger-Brauns, M.J., Striessnig, J., Carbone, E. 2010. Loss of Cav1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 30:491-504.
- ✓ Marcotti, W., Johnson, S.L., Rusch, A., Kros, C.J. 2003. Sodium and calcium currents shape action potentials in immature mouse inner hair cells. *J Physiol. (Lond).* 552:743–761.
- ✓ Marengo, F.D., Monck, J.R. 2003. Spatial distribution of Ca<sup>(2+)</sup> signals during repetitive depolarizing stimuli in adrenal chromaffin cells. *Biophys J.* 85:3397-

3417.

- ✓ Martin-Moutot, N., Leveque, C., Sato, K., Kato, R., Takahashi, M., Seagar, M. 1995. Properties of omega-conotoxin MVIIC receptors associated with a 1A calcium channel subunits in rat brain. *FEBS Lett.* 366, 21-25.
- ✓ Masaki, H., Sato, Y., Luo, W., Kranias, E.G., Yatani, A. 1997. Phospholamban deficiency alters inactivation kinetics of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mouse ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 272: H606-612.
- ✓ McAllister, A.K., Katz, L.C., Lo, D.C. 1996. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron.* 17:1057-1064.
- ✓ McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W., Yoshikami, D. 1987. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:4327-4331.
- ✓ McCleskey, E.W. 1994. Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. New Biol.* 4:304-312.
- ✓ McDonough, S.I., Swartz, K.J., Mintz, I.M., Boland, L.M., Bean, B.P. 1996. Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by omega-conotoxin MVIIC. *J Neurosci.* 16:2612-2623.
- ✓ Meir, A., Ginsburg, S., Butkevich, A., Kachalsky, S.G., Kaiserman, I., Ahdut, R., Demirgoren, S., Rahamimoff, R. 1999. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. *Physiol Rev.* 79:1019-1088. Rev.
- ✓ Mermelstein, P.G., Bito, H., Deisseroth, K., Tsien, R.W. 2000. Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci.* 20:266-273.

- ✓ Michel-Béchet, M., Cotte, G., Picard, D., Haon, A.M. 1963. Ultrastructural Cytology of the Adrenal Medulla of the Golden Hamster (*Cricetus Auratus*). *Ann.Endocrinol.* 24:1044-1048.
  
- ✓ Michna, M., Knirsch, M., Hoda, J.C., Muenkner, S., Langer, P., Platzer, J., Striessnig, J., Engel, J. 2003. Cav1.3 (alpha1D) Ca<sup>2+</sup> currents in neonatal outer hair cells of mice. *J Physiol (Lond).* 553:747–758.
  
- ✓ Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., Numa, S. 1989. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.* 340: 230-233.
  
- ✓ Miljanich, G.P., Ramachandran, J. 1995. Antagonists of neuronal calcium channels: structure, function, and therapeutic implications. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35:707-734.
  
- ✓ Mintz, I.M., Adams, M.E., Bean, B.P. 1992a. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron.* 9:85-95.
  
- ✓ Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P., Adams, M.E.1992b. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature.* 355:827-829.
  
- ✓ Mintz, I.M.1994. Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIa. *J Neurosci.* 14(5 Pt 1):2844-2853.
  
- ✓ Misra, R.P., Bonni, A., Miranti, C.K., Rivera, V.M., Sheng, M., Greenberg, M.E. 1994. L-Type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J Biol Chem.* 269:25483–25493.
  
- ✓ Mishra, S.K., Hermsmeyer, K. 1994. Selective inhibition of T-type Ca<sup>2+</sup> channels by Ro 40-5967. *Circ.Res.* 75:144-148.

- ✓ Mogul, D.J., Adams, M.E., Fox, A.P. 1993. Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca<sup>2+</sup> current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron* 10:327–334.
- ✓ Monck, J.R., Robinson, I.M., Escobar, A.L., Vergara, J.L., Fernandez, J.M. 1994. Pulsed laser imaging of rapid Ca<sup>2+</sup> gradients in excitable cells. *Biophys J.* 67:505-514.
- ✓ Monje, V.D., Haack, J.A., Naisbitt, S.R., Miljanich, G., Ramachandran, J., Nasdasdi, L., Olivera, B.M., Hillyard, D.R., Gray, W.R. 1993. A new Conus peptide ligand for Ca channel subtypes. *Neuropharmacology.* 32:1141-1149.
- ✓ Montiel, C., López, M.G., Sánchez-García, P., Maroto, R., Zapater, P., García, A.G. 1995. Contribution of SK and BK channels in the control of catecholamine release by electrical stimulation of the cat adrenal gland. *J.Physiol.* 486 (Pt 2):427-437.
- ✓ Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., y col. 1991. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature.* 350: 398-402.
- ✓ Moro, M.A., López, M.G., Gandía, L., Michelena, P., García, A.G. 1990. Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem.* 185:243-248.
- ✓ Murata, T., Koide, N., Tsuboi, M., Kohno, S., Hikita, K., Kaneda, N. 2008a. Autocrine TGF-beta signaling is required for the GDNF/CNTF-induced neuronal differentiation of adrenal chromaffin tsAM5D cells expressing temperature-sensitive SV40 T-antigen. *Neurosci.Lett.* 438:42-47.
- ✓ Murata, T., Tsuboi, M., Koide, N., Hikita, K., Kohno, S., Kaneda, N. 2008b. Neuronal differentiation elicited by glial cell line-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor in adrenal chromaffin cell line tsAM5D

- immortalized with temperature-sensitive SV40 T-antigen. *J.Neurosci.Res.* 86:1694-1710.
- ✓ Namkung, Y., Skrypnik, N., Jeong, M.J., Lee, T., Lee, M.S., Kim, H.L., Chin, H., Suh, P.G., Kim, S.S., Shin, H.S. 2001. Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *J Clin Invest.* 108:1015-1022.
  - ✓ Nassar-Gentina, V., Pollard, H.B., Rojas, E. 1988. Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am.J.Physiol.* 254:C675-83.
  - ✓ Neher, E., Marty, A. 1982. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:6712-6716.
  - ✓ Nelson, M.T., Laher, I., Worley, J. 1988. Membrane potential regulates dihydropyridine inhibition of single calcium channels and contractin of rabbit mesenteric artery. In: Vanhoutte PM, Paoletti R, Govoni S, eds. *Calcium Antagonists: Pharmacology and Clinical Research.* New York, NY: New York Academy of Sciences; 1988:47-50.
  - ✓ Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X.h, Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J.A., Dooley, D.J., Nadasdi, L., Tsien, R.W., Lemos, J., Miljanich, G. 1998. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysteroecrates gigas*. *Biochemistry.* 37:15353-15362.
  - ✓ Niidome, T., Kim, M.S., Friedrich, T., Mori, Y. 1992. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 308: 7-13.
  - ✓ Norris, C.M., Halpain, S., Foster, T.C. 1998. Reversal of age-related alterations in synaptic plasticity by blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci.* 18:3171–3179.

- ✓ Novara, M., Baldelli, P., Cavallari, D., Carabelli, V., Giaccipoli, A., Carbone, E. 2004. Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J.Physiol.* 558:433-449.
- ✓ Nowycky, M.C., Fox, A.P., Tsien, R.W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium antagonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- ✓ Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Luque, F.A., Gray, W.R. 1984. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry.* 23:5087-5090.
- ✓ Olivera, B.M., Gray, W.R., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Varga, J., Rivier, J., de Santos, V., Cruz, L.J. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science.* 230:1338-1343.
- ✓ Olson, L., Backlund, E.O., Ebendal, T., Freedman, R., Hamberger, B., Hansson, P., Hoffer, B., Lindblom, U., Meyerson, B., Strömberg, I. 1991. Intraputaminial infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson's disease. One-year follow-up of first clinical trial. *Arch.Neurol.* 48:373-381.
- ✓ Olson, P.A., Tkatch, T., Hernandez-Lopez, S., Ulrich, S., Ilijic, E., Mugnaini, E., Zhang, H., Bezprozvanny, I., Surmeier, D.J. 2005. G-protein-coupled receptor modulation of striatal CaV1.3 L-type Ca<sup>2+</sup> channels is dependent on a Shank-binding domain. *J Neurosci.* 25:1050-1062.
- ✓ Pan, C.Y., Kao, L.S. 1997. Catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells: the role of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and the intracellular Ca<sup>2+</sup> pool. *J Neurochem.* 69:1085-1092.
- ✓ Pelto-Huikko, M., Salminen, T., Hervonen, A. 1985. Localization of enkephalins in adrenaline cells and the nerves innervating adrenaline cells in



rat adrenal medulla. *Histochemistry*. 82:377-383.

- ✓ Pereverzev, A., Mikhna, M., Vajna, R., Gissel, C., Henry, M., Weiergräber, M., Hescheler, J., Smyth, N., Schneider, T. 2002. Disturbances in glucose-tolerance, insulin-release, and stress-induced hyperglycemia upon disruption of the Ca (v) 2.3 (alpha 1E) subunit of voltage-gated Ca (2+) channels. *Mol.Endocrinol*. 16:884-895.
- ✓ Pérez-Alvarez, A., Albillos, A. 2007. Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *J.Neurochem*. 103:2281-2290.
- ✓ Pérez-Alvarez, A., Hernández-Vivanco, A., Cano-Abad, M., Albillos, A. 2008. Pharmacological and biophysical properties of Ca<sup>2+</sup> channels and subtype distributions in human adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 456:1149-1162.
- ✓ Pérez-Alvarez A, Hernández-Vivanco A, Albillos A.2010. Past, present and future of human chromaffin cells: role in physiology and therapeutics. *Cell Mol Neurobiol*. 30:1407-1415. Rev.
- ✓ Pérez-Alvarez A, Hernández-Vivanco A, Caba-González JC, Albillos A. 2011. Different roles attributed to Cav1 channel subtypes in spontaneous action potential firing and fine tuning of exocytosis in mouse chromaffin cells. *J Neurochem*. 116:105-121.
- ✓ Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., Lee, J.H. 1998. Molecular characterization of a neuronal lowvoltage-activated T-type calcium channel. *Nature*. 391: 896-900.
- ✓ Pérez-Reyes, E. 1999. Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol.Life Sci*. 56:660-669.
- ✓ Pérez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type

calcium channels. *Physiol.Rev.* 83:117-161.

- ✓ Plant, T.D. 1988. Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *J Physiol (Lond)*. 404:731–747.
- ✓ Platzer, J., Engel, J., Schrott-Fischer, A., Stephan, K., Bova, S., Chen, H., Zheng, H., Striessnig, J. 2000. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell*. 102:89-97.
- ✓ Plummer, M.R., Logothetis, D.E., Hess, P. 1989. Elementary Properties and Pharmacological Sensitivities of Calcium Channels in Mammalian Peripheral Neurons. *Neuron* 2:1453-1463.
- ✓ Polo-Parada, L., Chan, S.A., Smith, C. 2006. An activity-dependent increased role for L-type calcium channels in exocytosis is regulated by adrenergic signaling in chromaffin cells. *Neuroscience*. 143:445-459.
- ✓ Popov, A.A. 1988. Ultrastructural changes in the size of mast cell granules and in the granular matrix during an experimental anaphylactic shock. *Anat Anz*. 166:267-273.
- ✓ Prakriya, M., Lingle, C.J. 1999. BK channel activation by brief depolarizations requires Ca<sup>2+</sup> influx through L- and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat chromaffin cells. *J Neurophysiol*. 81:2267-2278.
- ✓ Qian, J., Noebels, J.L. 2001. Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels and neurotransmitter release at the terminal of a mouse cortical neuron. *J.Neurosci*. 21:3721-3728.
- ✓ Randall, A., Tsien, R.W. 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca<sup>2+</sup> channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J.Neurosci*. 15:2995-3012.
- ✓ Regan L. J., Sah, D.W.Y., Bean, B.P. 1991. Calcium channels in Rat Central and Periphetal Neurons. High-Threshold Current Resistant to Dihydropyridme

Blockers and Omega-Conotoxin. *Alemon*. 6:269-280.

- ✓ Regulla, S., Schneider, T., Nastainczyk, W., Meyer, H.E., Hofmann, F. 1991. Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium-channel  $\alpha$  1 subunit. *EMBO J*. 10: 45-49.
- ✓ Richard, S., Charnet, P., Nerbonne, J.M. 1993. Interconversion between distinct gating pathways of the high threshold calcium channel in rat ventricular myocytes. *J.Physiol*. 462:197-228.
- ✓ Rosa, J.M., de Diego, A.M., Gandía, L., García, A.G. 2007. L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 357:834-839.
- ✓ Rosmaninho-Salgado, J., Araújo, I.M., Alvaro, A.R., Mendes, A.F., Ferreira, L., Grouzmann, E., Mota, A., Duarte, E.P., Cavadas, C. 2009. Regulation of catecholamine release and tyrosine hydroxylase in human adrenal chromaffin cells by interleukin-1beta: role of neuropeptide Y and nitric oxide. *J Neurochem*. 109:911-22.
- ✓ Roth, D., Burgoyne, R.D. 1994. SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*. 351:207-210.
- ✓ Sah, P., McLachlan, E.M. 1992. Potassium currents contributing to action potential repolarization and the afterhyperpolarization in rat vagal motoneurons. *J Neurophysiol*. 68: 1834–1841.
- ✓ Sanguinetti, M.C., Kass, R.S. 1984. Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circ Res*. 55:336-348.
- ✓ Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., Adams, M.E., Tsien, R.W. 1993. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI)

calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron*. 11:291-303.

- ✓ Scholz, K.P., Miller, R.J. 1996. Presynaptic inhibition at excitatory hippocampal synapses: development and role of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurophysiol*. 76:39–46.
- ✓ Schuster, A., Lacinova, L., Klugbauer, N., Ito, H., Birnbaumer, L., Hofmann, F. 1996. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J*. 15: 2365-2370.
- ✓ Seino. S., Chen. L., Seino. M., Blondel. O., Takeda. J., Johnson. J. H., Bell. G.I. 1992. Cloning of the  $\alpha$ 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic  $\beta$  cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 84-588.
- ✓ Seward EP, Chernevskaya NI, Nowycky MC.1995. Exocytosis in peptidergic nerve terminals exhibits two calcium-sensitive phases during pulsatile calcium entry. *J Neurosci*. 15(5 Pt 1):3390-3399.
- ✓ Shao, L.R., Halvorsrud, R., Borg-Graham, L., Storm, J.F. 1999. The role of BK-type Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in spike broadening during repetitive firing in rat hippocampal pyramidal cells. *J Physiol*. 521: 135–146.
- ✓ Sharma, P., Hingorani, A., Jia, H., Ashby, M., Hopper, R., Clayton, D., Brown, M.J.1998. Positive association of tyrosine hydroxylase microsatellite marker to essential hypertension. *Hypertension*. 32:676–682.
- ✓ Shirokov, R. 1999. Interaction between permeant ions and voltage sensor during inactivation of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Physiol*. 518:697-703.
- ✓ Singh, A., Gebhart, M., Fritsch, R., Sinnegger-Brauns, M.J., Poggiani, C., Hoda, J.C., Engel, J., Romanin, C., Striessnig, J., Koschak, A. 2008. Modulation of voltage- and Ca<sup>2+</sup>-dependent gating of CaV1.3 L-type calcium channels by alternative splicing of a C-terminal regulatory domain. *J Biol Chem*. 283:20733-20744.

- ✓ Sinnegger-Brauns, M.J., Hetzenauer, A., Huber, I.G., Renström, E., Wietzorrek, G., Berjukov, S., Cavalli, M., Walter, D., Koschak, A., Waldschütz, R., Hering, S., Bova, S., Rorsman, P., Pongs, O., Singewald, N., Striessnig, J. 2004. Isoform-specific regulation of mood behavior and pancreatic beta cell and cardiovascular function by L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Clin Invest.* 113:1382-1384.
- ✓ Smith, C., Moser, T., Xu, T., Neher, E. 1998. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron.* 20:1243-1253.
- ✓ Solaro, C.R., Lingle, C.J. 1992. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science.* 257:1694-1698.
- ✓ Solaro, C.R., Prakriya, M., Ding, J.P., Lingle, C.J. 1995. Inactivating and noninactivating Ca (2+) - and voltage-dependent K<sup>+</sup> current in rat adrenal chromaffin cells. *J.Neurosci.* 15:6110-6123.
- ✓ Solaro, C.R., Ding, J.P., Li, Z.W., Lingle, C.J. 1997. The cytosolic inactivation domains of BK<sub>i</sub> channels in rat chromaffin cells do not behave like simple, open-channel blockers. *Biophys J.* 1997 73:819-830.
- ✓ Song, H., Nie, L., Rodriguez-Contreras, A., Sheng, Z.H., Yamoah, E.N. 2003. Functional interaction of auxiliary subunits and synaptic proteins with Ca(v)1.3 may impart hair cell Ca<sup>2+</sup> current properties. *J Neurophysiol.* 89:1143–1149.
- ✓ Soong, T.W., Stea, A., Hodson, C.D., Dubel, S.J., Vincent, S.R., Snutch, T.P. 1993. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science.* 260:1133-1136.
- ✓ Sorensen, J.B. 2004. Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch.* 448:347-362.

- ✓ Sortwell, C.E., Pappas, G.D., Sagen, J. 1995. Chromaffin cell xenografts in the rat neocortex can produce antidepressive activity in the forced swimming test. *Exp.Brain Res.* 103:59-69.
- ✓ Starr, T.V., Prystay, W., Snutch, T.P. 1991. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:5621-5625.
- ✓ Striessnig, J. 2007. C-terminal tailoring of L-type calcium channel function. *J Physiol.* 585: 643-644.
- ✓ Striessnig, J., Koschak, A. 2008. Exploring the function and pharmacotherapeutic potential of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels with gene knockout models. *Channels (Austin).* 2:233-251.
- ✓ Strom, T.M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B.H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Ruther, K., Drescher, B., Sauer, C., Zrenner, E., Meitinger, T., Rosenthal, A., Meindl, A. 1998. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat. Genet.* 19: 260-263.
- ✓ Sudhof, T.C. 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* 375:645-653.
- ✓ Sun, X., Gu, X.Q., Haddad, G.G. 2003. Calcium influx via L- and N-type calcium channels activates a transient large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in mouse neocortical pyramidal neurons. *J Neurosci.* 23: 3639–3648.
- ✓ Takiyuddin, M.A., Brown, M.R., Dinh, T.Q., Cervenka, J.H., Braun, S.D., Parmer, R.J., Kennedy, B., O'Connor, D.T. 1994. Sympatho-adrenal secretion in humans: factors governing catecholamine and storage vesicle peptide co-release. *J.Auton.Pharmacol.* 14:187-200.
- ✓ Tang, C.M., Presser, F., Morad, M. 1988. Amiloride selectively blocks the low

threshold (T) calcium channel. *Science* 240:213-215.

- ✓ Tischler, A.S., DeLellis, R.A., Biales, B., Nunnemacher, G., Carabba, V., Wolfe, H.J. 1980. Nerve growth factor-induced neurite outgrowth from normal human chromaffin cells. *Lab.Invest.* 43:399-409.
- ✓ Tischler, A.S. 2002. Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 971:366-370.
- ✓ Tkaczuk, J., Bes, J.C., de Bouet du Portal, H., Tafani, M., Duplan, H., Abbal, M., Lazorthes, Y., Ohayon, E. 1997. Intrathecal allograft of chromaffin cells for intractable pain treatment: a model for understanding CNS tolerance mechanisms in humans. *Transplant.Proc.* 29:2356-2357.
- ✓ Trifaro, J.M. 2002. Molecular biology of the chromaffin cell. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 971:11-18.
- ✓ Triggle, D.J. 1991. Calcium-channel drugs: structure-function relationships and selectivity of action. *J Cardiovascular Pharmacol.* 18:S1-S6.
- ✓ Tsien, R.W., Ellinor, P.T., Horne, W.A. 1991. Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 12:349-354.
- ✓ Tsien, R.W., Lipscombe, D., Madison, D., Bley, K., Fox, A. 1995. Reflections on Ca(2+)-channel diversity, 1988–1994. *Trends Neurosci* 18:52–54.
- ✓ Ulate, G., Scott, S.R., González, J., Gilabert, J.A., Artalejo, A.R. 2000. Extracellular ATP regulates exocytosis in inhibiting multiple Ca(2+) channel types in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 439:304-314.
- ✓ 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.U.S.A.* 75:3498-3502.

- ✓ Unsicker, K., Rieffert, B., Ziegler, W. 1980. Effects of cell culture conditions, nerve growth factor, dexamethasone, and cyclic AMP on adrenal chromaffin cells in vitro. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 25:51-59.
- ✓ Unsicker, K., Krieglstein, K. 1996. Growth factors in chromaffin cells. *Prog.Neurobiol.* 48:307-324.
- ✓ Valentino, K., Newcomb, R., Gadbois, T., Singh, T., Bowersox, S., Bitner, S., Justice, A., Yamashiro, D., Hoffman, B.B., Ciaranello, R. 1993. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:7894-7897.
- ✓ Vega, T., De Pascual, R., Bulbena, O., García, A.G. 1995. Effects of omega-toxins on noradrenergic neurotransmission in beating guinea pig atria. *Eur.J.Pharmacol.* 276:231-238.
- ✓ Vignali, S., Leiss, V., Karl, R., Hofmann, F., Welling, A. 2006. Characterization of voltage-dependent sodium and calcium channels in Mouse pancreatic A- and B-cells. *J Physiol.* 572:691-706.
- ✓ Villarroya, M., Olivares, R., Ruíz, A., Cano-Abad, M.F., de Pascual, R., Lomax, R.B., López, M.G., Mayorgas, I., Gandía, L., García, A.G. 1999. Voltage inactivation of Ca<sup>2+</sup> entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca<sup>2+</sup> channels of bovine chromaffin cells. *J.Physiol.* 516 (Pt 2):421-432.
- ✓ Von Ruden, L., Neher, E. 1993. A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science.* 262:1061-1065.
- ✓ Wagner, J.A., Snowman, A.M., Biswas, A., Olivera, B.M., Snyder, S.H. 1988. Omega conotoxin GVIA binding to a high-affinity receptor in brain: characterization, calcium sensitivity, and solubilization. *J. Neurosci.* 8:3354-3359.



- ✓ Wakade, A.R. 1981. Studies on secretion of catecholamines evoked by acetylcholine or transmural stimulation of the rat adrenal gland. *J Physiol.* 313:463-480.
- ✓ Wakade, A.R. 1988. Noncholinergic transmitter(s) maintains secretion of catecholamines from rat adrenal medulla for several hours of continuous stimulation of splanchnic neurons. *J.Neurochem.* 50:1302-1308.
- ✓ Wakade, A.R. 1998. Multiple transmitter control of catecholamine secretion in rat adrenal medulla. *Adv.Pharmacol.* 42:595-598.
- ✓ Wallace, D.J., Chen, C., Marley, P.D. 2002. Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J.Physiol.* 540:921-939.
- ✓ Watanabe, T., Kalasz ,H., Yabana, H., Kuniyasu, A., Mershon, J., Itagaki, K., Vaghy P.L., Naito, K., Nakayama, H., Schwartz, A. 1993. Azidobutyryl clentiazem a new photoactivatable diltiazem analog, labels benzothiazepine binding sites in the  $\alpha_1$  subunit of the skeletal muscle calcium channel. *FEBS Lett.* 334: 261-264.
- ✓ Weiergräber, M., Pereverzev, A., Vajna, R., Henry, M., Schramm, M., Nastainczyk, W., Grabsch, H., Schneider, T. 2000. Immunodetection of alpha1E voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel in chromogranin-positive muscle cells of rat heart, and in distal tubules of human kidney. *J.Histochem.Cytochem.* 48:807-819.
- ✓ Westenbroek, R.E., Hoskins, L., Catterall, W.A. 1998. Localization of  $Ca^{2+}$  channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J.Neurosci.* 18:6319-6330.
- ✓ Weston JA. 1970. The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv Morphol.* 8:41–114.

- ✓ Wheeler, D.B., Randall, A., Tsien, R.W. 1994. Roles of N-type and Q-type Ca<sup>2+</sup> channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science*. 264:107-111.
- ✓ Williams, M.E., Feldman, D.H., McCue, A.F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S.B., Harpold, M.M. 1992a. Structure and functional expression of  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron*. 8: 71-84.
- ✓ Williams, M.E., Brust, P.F., Feldman, D.H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A.F., Velicelebi, G., Ellis, S.B., Harpold, M.M. 1992b. Structure and functional expression of an  $\omega$ -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science*. 257:389-395.
- ✓ Wilson, S.P., Kirshner, N. 1977. The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J.Neurochem*. 28:687-695.
- ✓ Winkler, H., Fischer-Colbrie, R. 1998. Regulation of the biosynthesis of large dense-core vesicles in chromaffin cells and neurons. *Cell Mol Neurobiol*. 18:193-209. Rev.
- ✓ Wu, L.G., Saggau, P. 1994. Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3- CA1 synapses of the hippocampus. *J Neurosci* 14:5613–5622.
- ✓ Xu, W., Lipscombe, D. 2001. Neuronal Ca(V)1.3 $\alpha$ (1) L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci*. 21:5944-5951.
- ✓ Yaari, Y., Hamon, B., Lux, H.D. 1987. Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235:680-682.
- ✓ Yang, P.S., Alseikhan, B.A., Hiel, H., Grant, L., Mori, M.X., Yang, W., Fuchs, P.A., Yue, D.T. 2006. Switching of Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of Ca(v)1.3

- channels by calcium binding proteins of auditory hair cells. *J Neurosci.* 26:10677-10689.
- ✓ Yasuda, R., Sabatini, B.L., Svoboda, K. 2003. Plasticity of calcium channels in dendritic spines. *Nat Neurosc.* 6: 948-955.
  - ✓ Yokoyama, C.T., Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Soong, T.W., Snutch, T.P., Catterall, W.A. 1995. Biochemical properties and subcellular distribution of the neuronal class E calcium channel alpha 1 subunit. *J.Neurosci.* 15:6419-6432.
  - ✓ Zhang, L., Rao, F., Wessel, J., Kennedy, B.P., Rana, B.K., Taupenot, L., Lillie, E.O., Cockburn, M., Schork, N.J., Ziegler, M.G., O'Connor, D.T. 2004. Functional allelic heterogeneity and pleiotropy of a repeat polymorphism in tyrosine hydroxylase: prediction of catecholamines and response to stress in twins. *Physiol Genomics.* 19:277-291.
  - ✓ Zhang, Z., Xu, Y., Song, H., Rodriguez, J., Tuteja, D., Namkung, Y., Shin, H.S. Chiamvimonvat, N. 2002. Functional roles of Ca(v)1.3 (alpha(1D)) calcium channel in sinoatrial nodes: insight gained using gene-targeted null mutant mice. *Circ Res.* 90:981-987.
  - ✓ Zhou, X.F., Livett, B.G. 1990. Substance P has biphasic effects on catecholamine secretion evoked by electrical stimulation of perfused rat adrenal glands in vitro. *J.Auton.Nerv.Syst.* 31:31-39.
  - ✓ Zhou, Z., Mislér, S. 1995. Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem.* 270:3498-34505.
  - ✓ Zühlke, R.D., Pitt, G.S., Deisseroth, K., Tsien, R.W., Reuter, H. 1999. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature.* 399: 159-162.

**AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación de la Universidad Autónoma de Madrid (entidad financiadora de mi beca predoctoral FPU-UAM) y de los diferentes proyectos concedidos por la Comunidad de Madrid o el Ministerio de Ciencia e Innovación a mi directora de tesis, la Dra. Almudena Albillos.

No puedo dejar de agradecer especialmente su colaboración y solidaridad a los donantes de órganos y a sus familiares, por el gran esfuerzo que hacen a la hora de autorizar las donaciones, ya que sin ellos nuestro trabajo no podría ser una realidad. Al igual que agradezco su colaboración y coordinación a los equipos médicos de los hospitales que trabajan con nosotros (Hospital Universitario Ramón y Cajal, Hospital Universitario La Paz, Hospital Clínico San Carlos, Hospital Doce de Octubre, Fundación Jiménez Díaz).

El trabajo mostrado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado entre los años 2007 y 2013 en la Universidad Autónoma de Madrid. En este tiempo he conocido a mucha gente que me ha ayudado mucho no sólo a nivel profesional, sino que ha pasado a formar parte de mi vida y ha sido mi mayor apoyo en el lugar donde he pasado la mayor parte del día, el laboratorio. Por eso, no tendría hojas para tanto agradecimiento, pero ellos saben perfectamente lo que les quiero decir.

Doy las gracias a mi tutora la Dra. **Almudena Albillos**. Le agradezco la confianza que siempre ha depositado en mí y la oportunidad que me dio para entrar en su laboratorio y aprender a su lado.

A mis compañeros **Alberto, José Carlos y Tomás**, que no sólo me enseñaron todo lo que hoy en día sé del complicado mundo de la electrofisiología, sino que además me hicieron ver que aunque la paciencia y la disciplina son las bases esenciales para ser un buen investigador, estas no funcionan si no se acompañan con una gran sonrisa.

A mi compañera **Bea**, por querer aprender a mi lado este último año y compartir conmigo tantas noches en vela “cultivando”.

A mis **brujitas del L-2**, a mis **chicas del L-7**, a mis compañeros de desayunos, comidas y de charlas fugaces que valían más que cualquier conversación de horas... porque todos habéis formado parte de mi vida estos años y sin vuestros ánimos hoy esta Tesis posiblemente no estaría acabada.

El capítulo final de mis agradecimientos va dirigido a mi **familia** y a mis **amigos**. Por aguantar tantos años mis agobios, mis malos humores, mis prisas por terminar trabajos, por no poder quedar, por no tener tiempo para vosotros, por salir corriendo cuando sonaba el móvil de guardias, y porque a pesar de todo siempre habéis seguido a mi lado.

Y como no, gracias a mi marido **Luis** y a mi pequeño **Bruno**. Porque son los que consiguen que por muy duro que haya sido el día en mi cara se dibuje siempre al llegar a casa una GRAN SONRISA.