

R. 17.654
0

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
BIBLIOTECA CENTRAL

Que inscribo en esta Tesis Doctoral
al folio 197 número 104 del libro
correspondiente a 23 JUN 1991
Sevilla, _____

El Jefe del Departamento de Tesis,

Alvaro Raffo



CANALES DE CALCIO DE LAS CELULAS GLOMICAS Y SU MODULACION POR DOPAMINA

Alberto Rodríguez Benot

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

Sevilla, 1991



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA:
FISILOGIA MEDICA Y BIOFISICA
FACULTAD DE MEDICINA

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4 - 41009 SEVILLA - Teléfs. (95) 437 15 46 - 490 00 66 - Fax (95) 490 00 67

D. José López Barneo, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Sevilla, adscrito al Departamento de Fisiología: Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina

CERTIFICA:

Que D. Alberto Rodríguez Benot, Licenciado en Medicina, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "CANALES DE CALCIO DE LAS CELULAS GLOMICAS Y SU MODULACION POR DOPAMINA", y que este trabajo reúne las características para que, una vez defendido ante el Tribunal correspondiente, se presente para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

Sevilla a 18 de junio de 1991

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. López Barneo', with a long horizontal flourish extending to the right.

José López Barneo

Quiero expresar mi agradecimiento a José López Barneo por enseñarme a *leer* y *escribir* científicamente y por su apoyo constante -no sólo científico, sino también, y sobre todo, humano- a lo largo de los casi cuatro años que hemos convivido durante mi formación académica. A José Ramón López López, Constancio González y Roberto Gallego, de quienes aprendí a poner a punto la preparación del cuerpo carotídeo. A Pura Bolaños, por su ayuda inestimable durante los registros de la regulación metabólica de la corriente de calcio. A Juan Ureña, quien me enseñó -o por lo menos lo intentó- todo lo que sabe sobre el sistema de adquisición de señales. A todos los miembros del Departamento de Fisiología (y especialmente a mis compañeros becarios y colaboradores) que, de una forma u otra, han hecho posible que este trabajo sea una realidad.

**a mi padre
a mi madre
a Rosario**

El aprender no tiene fin

**Este es uno de los "consejos musicales para la casa y la vida"
incluidos por Robert Schumann en la segunda edición de su
Album para la juventud (Album für die Jugend) en 1850.**

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
Canales de calcio	1
Acoplamiento estímulo-secreción en células glómicas del cuerpo carotídeo	9
OBJETIVOS	12
Objetivos generales	12
Objetivos específicos	13
MATERIAL Y METODOS	14
1. Dispersión y cultivo de células	14
1.1 Cirugía y extracción de los cuerpos carotídeos	14
1.2 Tratamiento enzimático y dispersión celular	16
1.3 Cultivo de las células	16
2. Soluciones y productos químicos	19
2.1 Soluciones empleadas en la dispersión y el cultivo celular	19
2.2 Soluciones de registro	21
2.3 Fármacos, aminos biógenas y otros productos	23
3. Técnicas de registro	25
3.1 Descripción general	25
3.2 Micropipetas de vidrio	27
3.3 Diseño electrónico del sistema	27

CONTENIDO

4. Proceder experimental	31
5. Análisis de los resultados	32
5.1 Tratamiento de la señal	32
5.2 Ajuste de los datos y estadística	33
5.3 Diseño y presentación gráfica	34
RESULTADOS	35
A) Las células glómicas son excitables y generan potenciales de acción con un componente de calcio	35
1. Propiedades eléctricas pasivas	36
2. Corrientes iónicas totales registradas con la técnica de "patch-clamp" en la configuración "whole-cell"	37
3. Potenciales de acción en células glómicas	39
4. Aislamiento experimental de la corriente de calcio	41
B) Las células glómicas tienen una población homogénea de canales de calcio de alto umbral	43
1. Relación corriente-voltaje	43
2. Cinética de activación	47
3. Cinética de cierre	51
4. Inactivación	52
5. Modificaciones de las propiedades cinéticas de los canales de Ca^{2+} cuando se usa Ba^{2+} como transportador de carga	55
6. Resumen de las características electrofisiológicas de la corriente de calcio de las células glómicas	61
C) Los cationes divalentes y las dihidropiridinas modifican la corriente de Ca^{2+}	63
1. Bloqueantes inorgánicos. Efecto de metales de transición sobre la corriente de Ca^{2+} .	63
2. Bloqueantes orgánicos. Efectos de nifedipina y elgodipina	67

CONTENIDO

D) La corriente de Ca^{2+} está sujeta a regulación metabólica	74
1. El fenómeno del lavado de la corriente de calcio	75
2. El Ca^{2+} intracelular favorece la desaparición de la corriente de calcio	76
3. Los nucleótidos intracelulares previenen el lavado de la corriente de Ca^{2+}	81
4. La funcionalidad del canal de Ca^{2+} depende del equilibrio entre fosforilación y desfosforilación	85
E) Modulación de la corriente de Ca^{2+} por catecolaminas	91
1. La dopamina inhibe de forma selectiva y reversible la corriente de Ca^{2+}	91
2. La disminución de la corriente de Ca^{2+} por dopamina se debe a una reducción en el número de canales funcionales	94
3. La dopamina ejerce su efecto modulador a concentraciones en el rango subnanomolar	97
4. El efecto de la dopamina es transitorio debido a un fenómeno de desensibilización	99
5. La inhibición de la corriente de Ca^{2+} por dopamina se ajusta a un modelo de receptor con tres estados funcionales	104
6. La dopamina posiblemente ejerce su acción a través de un receptor de alta afinidad unido a una proteína G	109
7. La noradrenalina tiene un efecto similar al de la dopamina sobre la corriente de Ca^{2+} , aunque con menor potencia	112
DISCUSION	114
A) Corriente de calcio en células glómicas	115
B) Regulación metabólica de la corriente de Ca^{2+}	120
C) Modulación de la corriente de Ca^{2+} por dopamina y noradrenalina	125

CONTENIDO

D) Implicación de la corriente de Ca^{2+} y de su modulación en la fisiología de cuerpo carotídeo	129
CONCLUSIONES	132
REFERENCIAS	136



INTRODUCCION

CANALES DE CALCIO

La existencia de una permeabilidad específica para calcio en células excitables se descubrió hace casi 40 años (Fatt y Katz, 1953), muy poco después de establecerse la teoría iónica del potencial de acción (Hodgkin y Huxley, 1952). Desde entonces los canales de Ca^{2+} han sido el foco de atención de muchos investigadores debido a su amplia distribución (desde seres unicelulares como el paramecio hasta los vertebrados) y al importante papel que juegan en la regulación de múltiples funciones bioquímicas y celulares, incluyendo contracción, secreción, excitabilidad, motilidad, crecimiento y diferenciación celular e incluso bioluminiscencia (Hagiwara y Byerly, 1981; Kostyuk, 1981; Tsien, 1983; Hille, 1984). Los canales de Ca^{2+} son el medio principal por el que el ion Ca^{2+} accede al líquido intracelular y han sido objeto de numerosas revisiones en los últimos años, donde se trata su estructura, diversidad y localización, sus propiedades biofísicas y farmacológicas, su regulación y modulación y su participación en diversos procesos celulares (Hagiwara y Byerly, 1981 y 1983; Kostyuk, 1981; Tsien, 1983; Bean, 1989; Tsien et al, 1988; Hess, 1990; Swandulla et al., 1991). Por lo tanto, en este apartado se presenta sólo una breve revisión de los aspectos más relevantes de los canales de Ca^{2+} , junto a aspectos generales de la fisiología del cuerpo carotídeo,

INTRODUCCION

para poner en contexto los resultados de nuestro trabajo que se presentan más adelante.

Los canales de Ca^{2+} son proteínas transmembranarias que en su conformación abierta permiten el flujo pasivo de los iones Ca^{2+} a favor de su gradiente electroquímico (la concentración de Ca^{2+} intracelular es unas 10.000 veces menor que la extracelular). Los canales de Ca^{2+} mejor estudiados (y a los que el término se refiere de forma implícita) son los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, que se abren como respuesta a la despolarización de la membrana y por los que fluye de forma altamente selectiva el Ca^{2+} . Otros cationes divalentes como Ba^{2+} y Sr^{2+} , no presentes en cantidades apreciables en los líquidos extracelulares, también permeabilizan por los canales de Ca^{2+} . Existen canales cuya activación depende de la unión de ligandos que son específicos para cationes y por los que también fluyen iones Ca^{2+} además de Na^+ y K^+ . Dentro de estos canales los mejor estudiados son el canal asociado al receptor nicotínico de la acetilcolina, el canal activado por glutamato del tipo NMDA y el canal activado por ATP extracelular (Benham y Tsien, 1987; Mayer y Westbrook, 1987; ver Hille, 1984).

Durante muchos años las limitaciones técnicas han obstaculizado el estudio biofísico y bioquímico de los canales de Ca^{2+} (Hagiwara y Byerly, 1981), debido a la ausencia de preparaciones adecuadas y de ligandos específicos de éstos. Los canales de Na^+ , por ejemplo, se han estudiado con mucho más detalle al existir una preparación adecuada para su estudio, como el axón gigante del calamar, y un fármaco como la tetrodotoxina que se une a ellos con alta selectividad y afinidad. Sin embargo, la aparición de nuevos métodos de registro de la actividad de los canales iónicos, como la técnica de "patch-clamp" (Hamill et al., 1981) y el desarrollo de moléculas con acción potente y específica sobre los canales de Ca^{2+} , como las dihidropiridinas, han permitido grandes avances en su estudio y caracterización. La aplicación en los últimos años de técnicas de biología molecular

INTRODUCCION

ha dado lugar a un avance considerable en el estudio de las relaciones entre la estructura y la función de los canales iónicos que también ha afectado al conocimiento sobre los canales de Ca^{2+} . Recientemente se ha revelado la estructura primaria de canales de Ca^{2+} de músculo esquelético (Tanabe et al., 1987), cardíaco y liso (Mikami et al., 1989), así como de tejido neuronal de mamíferos (Mori et al., 1991).

Aunque existe probablemente una gran diversidad de canales de Ca^{2+} ampliamente distribuidos y con múltiples funciones, los canales de Ca^{2+} dependientes de los cambios del potencial de membrana se pueden clasificar en dos grandes grupos en base a sus propiedades biofísicas generales y a sus características farmacológicas. Esta clasificación no excluye la división en subgrupos dentro de cada una de ellas. Estos dos grandes grupos los forman los canales de bajo umbral de activación (LVA de "low voltage activated") y los de umbral de activación alto (HVA de "high voltage activated"; Carbone y Lux, 1984). Aunque existe una cierta confusión terminológica, los canales HVA se corresponden con los FD ("fast deactivating") o del tipo L, y los LVA con los SD ("slow deactivating") o del tipo T (Armstrong y Matteson, 1985; Tsien et al., 1988).

Los canales LVA (SD o T) tienen un umbral de activación a potenciales relativamente negativos, se inactivan rápidamente dependiendo del voltaje -por lo que se denominan canales T o de actividad transitoria- y su deactivación (o cierre) es lenta, razón por la que se acuñó el término SD indicado anteriormente. La conductancia de los canales LVA cuando se sustituye Ca^{2+} por Ba^{2+} como transportador de carga es similar en ambos casos. Los canales de Ca^{2+} HVA (tipo FD o L) se activan a potenciales más positivos y se inactivan más lentamente. La inactivación depende más de la concentración de calcio intracelular que del potencial, y la deactivación es un orden de magnitud más rápida que en los canales T. En estos canales la conductancia relativa es mayor para Ba^{2+} que para Ca^{2+} , y

INTRODUCCION

se conocen también como canales tipo L por su inactivación Lenta (*Long-lasting*) y su mayor (*Large*) conductancia unitaria (Nowycky et al., 1985; Fox et al., 1987). Dentro del grupo de canales de Ca^{2+} de alto umbral se ha propuesto la existencia de un nuevo tipo de canal denominado originalmente N basándose en registros de corriente unitaria y cuyas propiedades son intermedias entre los tipo T y L, pues tiene inactivación rápida y completa dependiente de potencial, conductancia unitaria intermedia y es resistente a la acción de las dihidropiridinas (Nowycky et al., 1985; Fox et al., 1987; Tsien et al., 1988). Este canal tipo N se ha descrito principalmente en tejido nervioso, razón por la que se denomina también canal de Ca^{2+} "neuronal". Los canales N se aceptan hoy como un subtipo de canales de alto umbral, lo que refleja que realmente hay una gran diversidad de canales de Ca^{2+} y que el intento de clasificarlos en grupos presenta muchas dificultades y no se ajusta a las observaciones experimentales.

Las propiedades farmacológicas de los canales de Ca^{2+} permiten diferenciarlos de otras conductancias iónicas y ayudan a una clasificación más detallada en base a su diferente sensibilidad a agonistas y antagonistas. Los canales de Ca^{2+} se bloquean por concentraciones μM de cationes como Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} o La^{3+} (Hagiwara y Takahashi, 1967; Lansman et al., 1986), aunque con diferente potencia según el tipo de canal. De igual forma los bloqueantes orgánicos del tipo verapamil, diltiazem y las dihidropiridinas (DHP) modifican en la mayoría de las preparaciones la actividad de los canales de alto umbral (Lee y Tsien, 1983). Estos fármacos, y especialmente las DHP, se utilizan ampliamente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Schwartz y Taira, 1983; Triggle, 1987) y se conocen con el nombre genérico de *calcioantagonistas* (Fleckenstein, 1977). Las DHP como nifedipina o nitrendipina producen un bloqueo de la corriente de Ca^{2+} de canales de alto umbral (Hess et al., 1984; Fox et al., 1987), mientras que otras como BAY K 8644 aumentan la amplitud de la corriente de Ca^{2+} (Brown et al., 1984). Las DHP tienen en ocasiones efectos opuestos a los esperados, y no es

INTRODUCCION

sorprendente encontrar a dosis bajas actividad agonista con nifedipina o nitrendipina (Hess, 1984; Boll y Lux, 1985) o antagonista con BAY K 8644 (Boll y Lux, 1985; Kasai et al., 1987). Las DHP parecen actuar de forma específica sobre los canales de Ca^{2+} tipo L, ya que no modifican los T ni los N (Tsien et al., 1988). Otros bloqueantes, como ω -conotoxina, parecen ser más selectivos para los canales de alto umbral de tipo N presentes en el tejido nervioso (McCleskey et al., 1987). Las características farmacológicas de los canales tipo T son menos conocidas. Existen compuestos bloqueantes con una mayor selectividad para canales de bajo umbral como el insecticida tetramethin (Tsunoo et al., 1985) y se ha descrito que el amiloride y las difenilhidantoínas bloquean más eficazmente los canales T que los L (Tang et al., 1988; Yaari et al., 1987). Otro agente que parece inhibir de forma selectiva la corriente de Ca^{2+} de bajo umbral es el octanol a dosis submicromolares (Llinás y Yarom, 1986). Los experimentos farmacológicos apoyan la existencia de diferentes tipos de canales de Ca^{2+} , pero una posible clasificación basada en la farmacología es todavía prematuro ya que se observa una diversidad aún mayor que la que se ha descrito con experimentos electrofisiológicos. La farmacología de los canales de Ca^{2+} está en fase muy inicial y es de esperar que la aparición de nuevos ligandos, junto al conocimiento de la estructura molecular de los canales de Ca^{2+} , contribuya en breve a establecer bases más precisas que permitan una clasificación de los canales basada en sus diferentes aspectos funcionales, moleculares y farmacológicos.

En la década de los 80, la aparición de ligandos específicos de los canales de Ca^{2+} ha permitido solubilizar y purificar los receptores de dihidropiridinas y las diferentes subunidades que forman los canales de Ca^{2+} en células musculares esqueléticas (en estas células la densidad de canales es 50-100 veces más alta que en cualquier otro tejido; Fosset et al., 1983). Takahashi et al. (1987) propusieron un modelo de canal de Ca^{2+} sensible a dihidropiridinas formado por cinco subunidades: α_1 , α_2 , β , γ y δ . El poro iónico estaría formado por la subunidad α_1 , que es

INTRODUCCION

hidrofóbica y contiene el receptor para las DHP y las fenilalquilaminas. La subunidad β es hidrofílica y al igual que la α_1 posee varios sitios susceptibles de ser fosforilados por quinasas intracelulares (Curtis y Catterall, 1985; Hosey et al., 1986; Imagawa et al., 1987; Glossman et al., 1988), por lo que se supone está situada en el lado citoplásmico del canal unida a éste por un enlace no covalente. Las subunidades α_2 y δ están unidas por puentes disulfuro y puesto que están glucosiladas y son hidrofílicas estarían localizadas en el lado extracelular del canal. La subunidad γ está también glucosilada y se dispondría rodeando el poro iónico. Aplicando técnicas de biología molecular se han obtenido las secuencias de aminoácidos de las subunidades α_1 y α_2 (Tanabe et al., 1987; Ellis et al., 1988), y muy recientemente se ha deducido la estructura primaria de un canal de Ca^{2+} del cerebro de conejo con técnicas de clonaje y secuenciación de DNA complementario (Mori et al., 1991). La subunidad α_1 posee una notoria homología con los canales de Na^+ y K^+ , y uno de sus segmentos parece ser el responsable de la voltaje-dependencia del canal (Noda et al., 1984; Papazian et al., 1987; Tanabe et al., 1987). Estas características estructurales confieren a los canales de Ca^{2+} de alto umbral una importante posibilidad de modulación y regulación metabólica, lo que determina que intervengan en el control de múltiples funciones celulares.

Los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} están presentes en una gran variedad de células incluyendo neuronas centrales y periféricas, células musculares (estriadas y lisas), células secretoras y otras consideradas clásicamente "no excitables" como fibroblastos, osteoblastos, endotelio vascular y glía (véanse revisiones de Tsien et al., 1988; Bean, 1989; Hess, 1990 y Swandulla et al., 1991). Por lo tanto, la diversidad de canales de Ca^{2+} es posiblemente fruto de un proceso adaptativo a la ejecución de funciones especializadas. En general, los canales de bajo umbral participan en la génesis de actividad eléctrica que permite los fenómenos oscilatorios en las células, mientras que los canales de alto umbral posiblemente son importantes para la inyección de Ca^{2+} al citosol y de este modo "disparar" eventos celulares

INTRODUCCION

dependientes de la concentración citosólica de este catión (Llinás y Yarom, 1981; Matteson y Armstrong, 1986; Tabares et al., 1989).

Se conoce desde hace tiempo que los canales de Ca^{2+} de alto umbral pierden su actividad rápidamente cuando se registran en parches escindidos de membrana (Fox et al., 1987; Carbone y Lux, 1987), lo que sugiere la existencia de mecanismos intracelulares que regulan su función. Probablemente la primera evidencia de que los canales de Ca^{2+} pueden modularse se obtuvo en músculo cardíaco, donde la adrenalina y noradrenalina aumentan la corriente de Ca^{2+} activando la quinasa dependiente de AMP_c (PKA) (Reuter y Scholtz, 1977; Cachelin et al., 1983; Bean et al., 1984; Hartzell y Fischmeister, 1986). La unión de las catecolaminas a un receptor β adrenérgico acoplado a una proteína G_s estimula la adenil ciclasa, aumentando el AMP_c y activando la PKA. Otros sistemas reguladores similares donde participa la PKA se han descrito en células secretoras (Armstrong y Eckert, 1987) y neuronas (Kaczmarek, 1988; Gross et al., 1990). Este mecanismo determina en último término la fosforilación de la proteína que forma el canal. No todos los canales tipo L son sensibles a elevaciones de AMP_c intracelular, y se han descrito otros sistemas diferentes de regulación que implican la activación de la proteína quinasa C (DeRiemer et al., 1985; Nishizuka, 1988), diferentes tipos de proteínas G (Yatani et al., 1987; Brown y Birnbaumer, 1988; Trautwein y Hescheler, 1990; Dolphin, 1990) y el inositol trifosfato (IP_3) (Vilven y Coronado, 1988). En neuronas, los canales de Ca^{2+} están modulados por una gran variedad de neurotransmisores y efectores entre los que se incluyen catecolaminas, acetilcolina, GABA, serotonina, opioides, somatostatina, encefalinas, análogos de adenosina, LHRH y sustancia P (véanse las revisiones de Miller, 1987, Tsien et al., 1988 y Bean, 1989). El efecto más frecuente de los neurotransmisores que modulan la corriente de Ca^{2+} de neuronas es de tipo inhibitorio (Dunlap y Fischbach, 1978), y en todos los casos donde se ha estudiado la atenuación de la corriente de Ca^{2+} está mediada por proteínas G, incluyendo G_s , G_i y G_o (Holz et al., 1986; Scott y

INTRODUCCION

Dolphin, 1987; Hescheler et al., 1987, Plummer, 1989; Dolphin, 1990). El acoplamiento funcional entre la proteína G y el canal iónico se realiza a través de proteína quinasa A (Armstrong y Eckert, 1987) o C (Rane y Dunlap, 1986), aunque es posible que la proteína G, por medio de su subunidad α , actúe directamente sobre el canal sin necesidad de intermediarios enzimáticos (Hess, 1990). Los canales tipo T no parecen estar modulados por mecanismos que producen elevación del AMP_c intracelular (Bean, 1985; Bonvallet, 1987), pero se ha descrito un efecto inhibitorio de un análogo del diacilglicerol en canales de bajo umbral (Marchetti y Brown, 1988) de células GH3. Queda por demostrar, no obstante, si la regulación de estos canales es debida a un efecto directo de los análogos del diacilglicerol o ésteres de forbol, o si está mediada realmente por la proteína quinasa C.

La consecuencias funcionales que se derivan de la modulación de los canales de Ca²⁺ son de gran importancia para una variedad de procesos que dependen de fluctuaciones del calcio intracelular. Un ejemplo es la liberación de neurotransmisores en la sinapsis en neuronas simpáticas, donde los agonistas adrenérgicos actuando sobre receptores presinápticos α_2 inhiben la liberación de noradrenalina al disminuir la corriente de Ca²⁺ en el terminal presináptico (Dunlap y Fischbach, 1978, 1981; Lipscombe et al., 1989). El control negativo sobre la secreción a través de la reducción de la corriente de Ca²⁺ es un fenómeno general de inhibición presináptica observado en numerosas neuronas que contienen diversos transmisores (Dunlap y Fischbach, 1981; Gross y McDonald, 1987; Lipscombe et al., 1989). Las catecolaminas son los neurotransmisores que en mayor medida participan en este proceso y tanto adrenalina, noradrenalina como dopamina disminuyen la corriente de Ca²⁺ en determinadas neuronas inhibiendo de esta forma la secreción o la transmisión sináptica (Dunlap y Fischbach, 1981; Reuter, 1983; Marchetti et al., 1986; Carbone et al., 1988).

INTRODUCCION

ACOPLAMIENTO ESTIMULO-SECRECION EN CELULAS GLOMICAS DEL CUERPO CATORIDEO

El cuerpo carotídeo es un quimiorreceptor arterial de mamíferos que detecta los cambios de presión parcial de oxígeno en sangre y es responsable de la hiperventilación observada en condiciones fisiológicas y patológicas que producen una disminución de PO_2 arterial (De Castro, 1928; Heymans et al., 1930; Fitzgerald y Lahiri, 1986). Actualmente se acepta que la hipoxia provoca una respuesta neurosecretora de las células glómicas o tipo I (presumiblemente los quimiorreceptores primarios), liberándose neurotransmisores que activan las fibras aferentes del nervio del seno carotídeo. Esta información sensorial se transmite al sistema nervioso central donde se induce una respuesta ventilatoria adecuada (véase Fidone y González, 1986).

El cuerpo carotídeo es un órgano par situado en la bifurcación de la arteria carótida común. De forma ovoide, esférica o discoide, está ricamente innervado y consiste en una asociación de islotes celulares y capilares denominados glomérulos (la unidad funcional del órgano, Seidl, 1975), rodeados por una fina cápsula de tejido conectivo que envuelve el órgano y penetra en su interior, dividiéndolo en numerosos lóbulos (De Castro, 1926, 1928). Esencialmente está formado por dos tipos celulares diferentes: células glómicas o tipo I (presumiblemente los quimiorreceptores) y células tipo II (sustentaculares) (Gómez, 1908). Las células tipo I son ricas en granos secretores que contienen dopamina, noradrenalina y otros neurotransmisores, y establecen sinapsis químicas con las terminaciones nerviosas aferentes presentes en la glándula (Belmonte y González, 1983; Fishman et al., 1985; Fidone y González, 1986). La disminución de la PO_2 provoca la liberación de los granos y la excitación de las fibras nerviosas aferentes del nervio del seno carotídeo (Eyzaguirre y Zapata, 1968; Fidone y González, 1986).

INTRODUCCION

El mecanismo por el que las células glómicas transducen el estímulo hipóxico ha sido discutido con detalle en numerosas revisiones aparecidas en la última década (Belmonte y González, 1983; Fidone y González, 1986; Fitzgerald y Lahiri, 1986). Tanto la disminución de PO_2 como el aumento de K^+ produce la liberación de dopamina de las células glómicas, fenómeno que depende del calcio extracelular y se inhibe por bloqueantes de canales de calcio (Fidone et al., 1982; Almaraz et al., 1986; Obeso et al., 1987). Por lo tanto, se ha sugerido que la respuesta a hipoxia debe implicar una despolarización de la membrana celular (Fishman et al., 1985; Rigual et al., 1986). Una demostración directa del papel quimiosensor de las células glómicas y de los posibles mecanismos implicados en su acción no se ha obtenido hasta fecha reciente gracias a experimentos electrofisiológicos. Las células tipo I poseen canales iónicos para Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Duchen et al., 1988; López-Barneo et al., 1988; Ureña et al., 1989) y la disminución de PO_2 inhibe selectivamente la corriente de K^+ en células glómicas de forma reversible (López-Barneo et al., 1988; López-López et al., 1989). Este efecto parece ser independiente de calcio y metabolitos intracelulares, por lo que se ha sugerido que el transductor podría estar asociado al propio canal de K^+ (López-Barneo et al., 1988). Recientemente se ha demostrado en microáreas de membrana escindidas de células glómicas la existencia de un canal de K^+ que se inhibe reversiblemente por la disminución de la PO_2 (Ganformina y López-Barneo, 1991).

Aunque en el cuerpo carotídeo el estímulo primario provoca la inhibición de un canal de K^+ , la respuesta secretora, al igual que ocurre en otros sistemas, es un mecanismo que requiere la entrada de Ca^{2+} extracelular al citosol (Fidone y González, 1982; Fishman et al., 1985; López López et al., 1989; véase Rubin, 1974). El cuerpo carotídeo es una estructura compleja y es muy posible que sobre el mecanismo básico de quimiotransducción se superpongan otros fenómenos que modulen la acción de los diferentes canales iónicos de la membrana. Como se indicó anteriormente existen diferentes transmisores en las propias células glómicas y en

INTRODUCCION

terminaciones eferentes, y se ha sugerido que éstos podrían actuar directamente sobre las conductancias iónicas de las propias células quimiorreceptoras o indirectamente modificando metabolitos intracelulares (Goldman y Eyzaguirre, 1984; Rigual et al., 1986; Benot y López-Barneo, 1990). De hecho, se ha descrito que el contenido de AMP_c en el cuerpo carotídeo completo se incrementa en presencia de dopamina y noradrenalina y que este metabolito aumenta linealmente con la disminución de PO₂ (Delpiano et al., 1984; Pérez-García et al., 1990) . En este trabajo se muestra que la corriente de Ca²⁺ está regulada por quinasas dependientes de AMP_c, y en un estudio preliminar reciente se ha descrito que los canales de Ca²⁺ de las células glómicas están modulados por dopamina (Benot y López-Barneo, 1990). Por lo tanto, la regulación de un canal sensible a O₂ representa sólo los pasos iniciales de la respuesta secretora a la hipoxia, que lejos de ser simple está modulada por un complejo sistema en el que participan tanto canales iónicos como mediadores intracelulares, además de otros posibles mecanismos que están todavía por determinar. El diseño de un sistema sofisticado es posiblemente necesario para llevar a cabo una regulación fina en la respuesta de las células quimiosensoras ante los diferentes estímulos fisiológicos y para su adaptación ante cambios en las condiciones ambientales.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

El presente trabajo se centra en el estudio de los canales de Ca^{2+} de alto umbral y de su modulación metabólica y por neurotransmisores. Los experimentos se han realizado en células quimiosensoras del cuerpo carotídeo debido a dos razones fundamentales: a) la electrofisiología de estas células se ha estudiado recientemente en nuestro laboratorio y resultados preliminares han mostrado que poseían una población bastante homogénea de canales de Ca^{2+} de alto umbral; b) la liberación de dopamina por las células glómicas depende del Ca^{2+} extracelular y en muchos aspectos esta estructura representa un modelo de acoplamiento excitación-secreción muy similar al de los terminales presinápticos. Por lo tanto, esta preparación parece adecuada para una caracterización biofísica y farmacológica de los canales de Ca^{2+} de alto umbral y para comprobar si, como ocurre en terminales presinápticos y otros sistemas secretores, existe autoregulación en el mecanismo de secreción. El abordaje experimental de estos objetivos obligó a establecer una situación en la que el registro de la corriente de Ca^{2+} fuese estable, lo que condujo al estudio de los factores metabólicos de los que depende la presencia en la membrana de canales de Ca^{2+} funcionales.

OBJETIVOS

OBJETIVOS ESPECIFICOS

a) Registro de corrientes iónicas totales y potenciales de acción con la técnica de "patch-clamp" en células tipo I dispersas y mantenidas en cultivo primario.

b) Aislamiento experimental de la corriente de Ca^{2+} y caracterización electrofisiológica de la misma.

c) Clasificación de la corriente de Ca^{2+} en base a sus propiedades biofísicas y farmacológicas y realización de un estudio comparativo con corrientes de Ca^{2+} de neuronas y células secretoras.

d) Análisis de los factores metabólicos de los que depende el mantenimiento de canales de Ca^{2+} funcionales, con especial atención a la influencia de la activación de fosfatasas y quinasas citosólicas que regulan el estado de fosforilación de estos canales iónicos.

e) Estudio de la modulación de la corriente de Ca^{2+} por dopamina y noradrenalina y de los posibles mecanismos moleculares implicados en su acción.

MATERIAL Y METODOS

1. Dispersión y cultivo de células

En el presente estudio se han utilizado conejos albinos de cepa New-Zeland, de ambos sexos, que pesaban entre 1.5 y 2 kilos. De estos animales se extrajeron los dos cuerpos carotídeos, que se trataron mecánica y enzimáticamente para obtener un cultivo adecuado de células glómicas que permitiese el registro electrofisiológico posteriormente. Las etapas y los métodos empleados a lo largo de este proceso se detallan a continuación.

1.1 *Cirugía y extracción de los cuerpos carotídeos*

Para conseguir un rendimiento adecuado de células se utilizaron dos conejos jóvenes por preparación, de los que se obtuvieron cuatro cuerpos carotídeos. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico en dosis de 40 mg/kg. de peso por vía intravenosa, a través de la vena marginal del pabellón auditivo. Tras inducir la anestesia con el barbitúrico se practicó una traqueotomía y se colocó una cánula traqueal para facilitar la función respiratoria. A continuación se realizó una incisión en la línea media del cuello separando los planos aponeuróticos y musculares hasta acceder a la bifurcación carotídea, que se extrajo completa pinzando y seccionando

MATERIAL Y METODOS

sus extremos arteriales. La misma operación se practicó en la zona contralateral, y las piezas resecaadas se colocaron en solución Tyrode a 4 °C previamente burbujeada con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). La intervención quirúrgica se finalizó con una sobredosis letal de anestésico. Los cuerpos carotídeos se disecaron con la ayuda de una lupa estereoscópica empleando pinzas de precisión del n° 5 y unas tijeras de iridectomía, con las que una vez limpios de tejido conectivo y arterial se trocearon cuidadosamente. A continuación se colocó el tejido en un frasco de 25 ml estéril y siliconizado con Sigmacote (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) que contenía solución Tyrode libre de calcio y magnesio (véase Tabla I). Este medio salino fue el utilizado para la dispersión enzimática y mecánica que se detalla en el apartado siguiente.

En un reducido número de experimentos se realizó cirugía crónica dirigida a denervar el cuerpo carotídeo unilateralmente seccionando y ligando los extremos del nervio del seno carotídeo o nervio de De Castro (1928). El cuerpo carotídeo contralateral se respetó para emplearlo como control del experimento. Para la intervención se utilizó un microscopio estereoscópico de larga distancia focal (Olympus, 200x, Tokio, Japón) y técnica quirúrgica con asepsia total. El acceso quirúrgico fue similar al descrito más arriba, aunque más conservador. Una vez visualizada la bifurcación carotídea se identificó el nervio del seno, pequeña rama del glossofaríngeo. El cuerpo carotídeo se denervó seccionando dicha rama y ligando sus extremos proximal y distal con seda 7-0 con objeto de evitar una posible reinervación. Veinte días después de la intervención se dispersaron y cultivaron las células de los cuerpos carotídeos controles y denervados de la misma forma que se detalla a continuación.

1.2 *Tratamiento enzimático y dispersión celular*

Los cuerpos carotídeos limpios y troceados se colocaron en 5 ml de la primera solución enzimática (Tabla II), previamente pasada por un filtro de 0.22 μm de poro (Millipore Corp. USA) incubándose a 36°C en un baño termostatado (Selecta, España) con agitación continua a 1.5 Hz durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó 3 minutos a 2100 rpm (800g) en una centrífuga Sorvall RT6000B (Dupont, USA) con temperatura controlada a 4 °C. Tras retirar el sobrenadante se resuspendió el tejido en 5 ml de la segunda solución enzimática (Tabla II) incubándose de nuevo en el baño de agitación a 36 °C durante 25 minutos. A lo largo del tratamiento enzimático se pipeteó la preparación en 6 ocasiones (entre 20 y 25 pipeteos cada vez) con pipetas Pasteur estériles y siliconizadas, cuyo orificio estaba pulido con fuego. Tras el tratamiento enzimático se añadió la solución de lavado (Tabla I) y se centrifugó 15 minutos a 2100 rpm y 4°C. Al cabo de este tiempo se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de solución de lavado con albúmina bovina al 2% (tipo V, Sigma), centrifugando por última vez otros 15 minutos. Todos los enzimas fueron suministrados por Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA).

1.3 *Cultivo de las células*

Todo el proceso de dispersión mecánica y cultivo celular se realizó en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar (Gelaire VB 85, Gelmans Instruments, Milán, Italia) dentro de una habitación especialmente diseñada y que se mantuvo libre de gérmenes con lámparas de luz ultravioleta. Todo el material de vidrio se autoclavó (Microclave, mod. S-477, Selecta, España) a 123° C durante 20 minutos, y el plástico utilizado se adquirió esterilizado por radiación gamma.

MATERIAL Y METODOS

Una vez terminada la digestión enzimática, la preparación se resuspendió en el medio de cultivo (Minimum Essential Medium, Earle's salts, Gibco, UK) suplementado con suero bovino fetal (5%), l-glutamina (1%) y penicilina-estreptomina (2%) (todos los suplementos de Gibco, UK). El medio contiene también bicarbonato (2g/l) para mantener un pH adecuado en el incubador de CO₂. La suspensión celular final se depositó cuidadosamente sobre 10 cubres de vidrio previamente tratados con poli-l-lisina (1mg/ml, Sigma) para facilitar la adherencia de las células. Los cubres se colocaron en el interior de placas Petri de plástico estériles de 35 mm (Nunc Intermed, Dinamarca). De esta forma se introdujeron en el incubador de CO₂ (Selecta, España) a 37°C, ambiente húmedo y atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Con el tampón bicarbonato del medio de cultivo el pH se estabilizó en 7.35. En esta situación el cultivo se mantuvo viable durante al menos una semana.

Antes de ser registradas, las células permanecieron en el incubador un periodo de reposo de al menos dos o tres horas después de la siembra para permitir su adhesión a los cubres de vidrio, condición que es indispensable para realizar los experimentos de "patch-clamp". El tiempo óptimo de incubación para conseguir buenos registros varió entre tres horas y tres días tras la dispersión, pues a partir del cuarto día el crecimiento de fibroblastos y sus prolongaciones contactan y rodean a las células glómicas, dificultando el acceso experimental. Algunas células quimiosensoras emitieron prolongaciones tras varios días de cultivo. La figura 1 muestra dos fotografías de células tipo I dispersas sobre un cubre de vidrio y una vez colocadas en la cámara de registro, tomadas en el microscopio invertido a 200 aumentos. La foto inferior está tomada con el electrodo situado sobre una célula glómica tras establecer la configuración "whole-cell" (nótese la relación de tamaño entre célula y pipeta). El aspecto general de la preparación vista al microscopio muestra células dispersas o en ocasiones formando grupos de dos o tres células, que a 400 aumentos aparecen redondeadas y birrefringentes. Su diámetro oscila entre

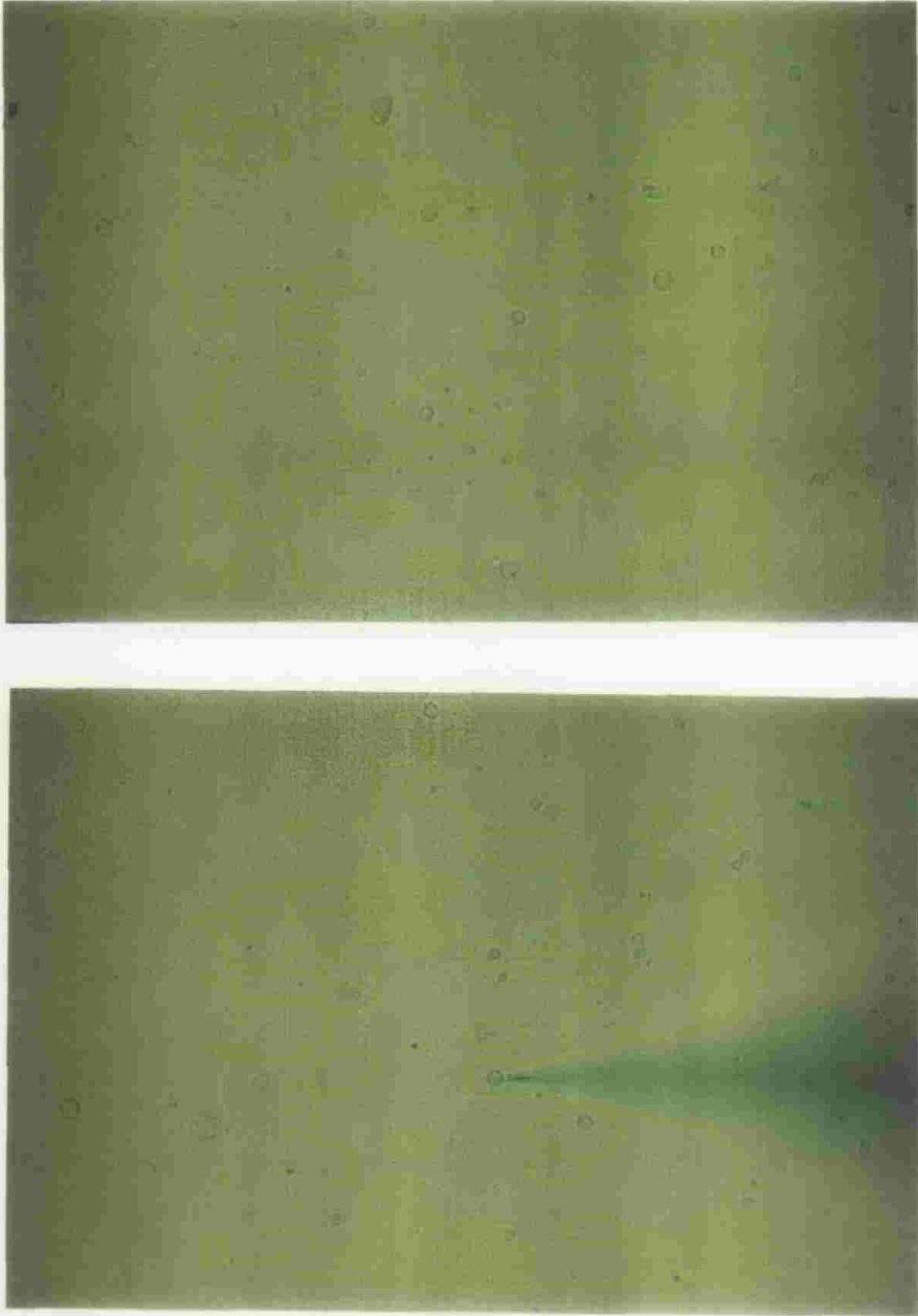


Figura 1. Células glómicas dispersas tras 24 horas en cultivo primario observadas al microscopio óptico (200 aumentos). En la imagen superior se distinguen células aisladas o en pequeños grupos de dos (zona izquierda). La fotografía inferior muestra la micropipeta de vidrio situada sobre una célula en el momento de realizar el sello. nótese la relación de tamaño célula-electrodo. La célula registrada tiene 12 μm de diámetro.

MATERIAL Y METODOS

9 y 13 μm y a veces se pueden observar en algunas de ellas pequeños gránulos pericitoplasmáticos que corresponden a vacuolas degenerativas. El transporte de las células desde el incubador hasta el laboratorio de registro se hizo mediante los cubres de vidrio, que tienen el tamaño apropiado para colocarse en la cámara de registro.

2. Soluciones y productos químicos

La composición de las diferentes soluciones utilizadas se muestran en las tablas I, II y III. Todas ellas se prepararon en el laboratorio (excepto el medio de cultivo) a partir de agua destilada y desionizada por ósmosis inversa y resinas de intercambio iónico (destilador Milli-Ro 6 Plus y desionizador Milli-Q Plus, Millipore; resistividad 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$). Todas las soluciones se pasaron por filtros de 0.22 μm de poro (Millipore). Las sales son de Sigma Chemical, así como las enzimas y la albúmina. La osmolaridad se ajustó entre 300 y 310 mOsm/Kg en las soluciones externas y 290-300 en las internas con un osmómetro de presión de vapor (Wescor, Utah, USA).

2.1. Soluciones empleadas en la dispersión y el cultivo celular

Los cuerpos carotídeos extraídos durante la cirugía se mantuvieron una solución Tyrode, que es básicamente una solución salina con Ca^{2+} y Mg^{2+} , suplementada con glucosa y piruvato y con un pH 7.4 a 4 °C (Tabla I). Una vez troceados se trasladaron a la misma solución pero sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , donde se añadieron las enzimas del primer tratamiento: tripsina 0.2 % (tipo III, Sigma), colagenasa 0.2 % (tipo IV, Sigma), y DNAasa II (tipo V, Sigma) 0.05 %, ajustando el pH a 7.4 a 37 °C (tabla II). El segundo tratamiento enzimático se diferencia del anterior en que no incluye tripsina y se ha añadido albúmina para contrarrestar la actividad proteolítica residual. Está compuesto por colagenasa tipo IV, 0.4 %,

MATERIAL Y METODOS

Tabla I. Soluciones de dispersión celular

TYRODE (mM)	estándar	0 Ca ²⁺ -Mg ²⁺	lavado
NaCl	140	140	140
KCl	4.7	4.7	4.7
CaCl ₂	2	-	-
MgCl ₂	1	-	-
Hepes	10	10	10
Glucosa	5	5	5
Piruvato	5	5	5
Albúmina	-	-	2%

pH 7.4 a 4 °C

Tabla II. Enzimas de la solución de incubación

ENZIMAS	I ^a solución enzimática	2 ^o solución enzimática
tripsina tipo III	0.2 %	-
colagenasa tipo IV	0.2 %	0.4 %
DNAasa II tipo V	0.05 %	0.05 %
albúmina bovina V	-	0.05 %

pH 7.4 a 36°C

DNAasa II 0.05 % y albúmina bovina tipo V, 0.5 %. La solución de lavado, que se emplea para sustituir a la de incubación y frenar la actividad enzimática, es una Tyrode sin Ca²⁺ y con albúmina V al 2 %, y pH 7.4 a 4 °C. El medio de cultivo

MATERIAL Y METODOS

y sus suplementos, que se expusieron en el apartado anterior, es un Minimum Essential Medium tamponado con bicarbonato (2g/l) y al que se le añadió glutamina, penicilina-estreptomicina y suero bovino fetal (véase apartado 1.3 de "MATERIAL Y METODOS"). En algunos casos se empleó fungizona al 1% para prevenir la contaminación del cultivo por hongos.

2.2 Soluciones de registro

La composición de las diferentes soluciones empleadas durante los registros de las corrientes iónicas se muestran en la tabla III. Por convención las referencias a las soluciones en el texto y en las figuras se hacen como externas // internas.

Las soluciones externas son las que bañan las células en la cámara de registro y simulan un medio extracelular estándar, o bien se modifican para aislar o facilitar el registro de algún componente de la corriente iónica. En ella se disolvieron fármacos como las dihidropiridinas, tetrodotoxina (TTX), bloqueantes inorgánicos como Cd^+ y Co^{2+} , y otros agentes objetos de estudio como las catecolaminas en nuestro caso. El pH se ajustó entre 7.35 y 7.40 con NaOH o ClH a temperatura ambiente, y la osmolaridad a 300-310 mOsm/Kg. La solución interna estándar es parecida en su composición iónica al citosol, aunque con algunas modificaciones según lo que se desee registrar. Esta solución se aplica situándola en el interior de la pipeta de vidrio, donde difunde al citosol cuando se establece la configuración "whole-cell". La solución interna más utilizada en este trabajo es aquella en la que se sustituye el K^+ por Cs^+ para evitar la corriente de potasio, con el fin de registrar de forma aislada la corriente de Ca^{2+} . El pH se ajustó entre 7.25 y 7.30 con KOH o CsOH y la osmolaridad fue 290-300 mOsm/Kg. Esta solución se suplementó en ciertos casos con quelantes de calcio (10 mM EGTA o BAPTA, Sigma) y nucleótidos como ATP-Mg (3-4mM, Sigma) y AMP_c para retardar el lavado de los canales de Ca^{2+} (véase apartado D de "RESULTADOS").

MATERIAL Y METODOS

Tabla III. Soluciones de registro

EXTERNAS	estándar	10Ca	10Ba	9Mg, 1Ca
NaCl	130	130	130	130
KCl	2.7	2.7	2.7	2.7
CaCl ₂	2	10	-	1
BaCl ₂	-	-	10	-
MgCl ₂	1	-	-	9
Hepes	10	10	10	10

INTERNAS	130 K	130Cs	110Cs, 20F
KCl	30	-	-
K-glutamato	80	-	-
KF	20	-	-
CsCl	-	130	110
CsF	-	-	20
MgCl ₂	2	2	2
Hepes	10	10	10
EGTA-BAPTA	10	10	10

Los valores se indican en mmol/litro.

pH de las soluciones, 7.35 a temperatura ambiente (20-24 °C).

Osmolaridad de las soluciones: externas, 300-310 mOsm/Kg.; internas, 290-300 mOsm/Kg.

MATERIAL Y METODOS

Los nucleótidos, almacenados en alícuotas en el congelador a -30°C , se añadieron a las soluciones justo antes del registro y se mantuvieron en frío ($4-8^{\circ}\text{C}$) al descongelarse para evitar en lo posible la pérdida de actividad. La concentración de calcio iónico libre en la solución interna se estimó en base a un programa de ordenador que tiene en cuenta las constantes de afinidad de EGTA por Ca^{2+} y Mg^{2+} a diferentes pH (Tabares et al., 1989).

2.3 Fármacos, aminas biógenas y otros productos

En el presente trabajo se han utilizado una serie de agentes que actúan modificando las corrientes iónicas cuando se aplicaron en la solución interna o externa. A continuación se detallan sus propiedades principales y la forma en que se han manejado. El aislamiento de la corriente de Ca^{2+} requiere el bloqueo de los canales de K^{+} y Na^{+} (véase apartado A de "RESULTADOS"). Lo primero se consigue sustituyendo en la solución interna K^{+} por Cs^{+} , y para abolir el componente de Na^{+} se utilizó un bloqueante específico, tetrodotoxina (TTX, Sigma) a una concentración $1\mu\text{M}$.

Una parte del estudio de las corrientes de Ca^{2+} consistió en el análisis del efecto de ciertos fármacos llamados "calcioantagonistas" (Fleckenstein, 1977), muy usados en clínica, que son derivados de las 1-4 dihidropiridinas. Son moléculas hidrofóbicas que bloquean la entrada de calcio al citosol (Hess et al, 1984). En este trabajo se han estudiado concretamente la nifedipina y la elgodipina. La nifedipina, - que es un fármaco bien conocido desde hace unos años y se ha utilizado en estudios electrofisiológicos previos (ver Fox et al, 1987) se disolvió en etanol absoluto, aplicándose a una dosis de $50\mu\text{M}$. Dado que este fármaco es inestable y pierde actividad al exponerse a la luz, los experimentos se realizaron en semioscuridad. La elgodipina es una molécula de muy reciente desarrollo de los Laboratorios Delagrangé, S.A. y que está en fase de experimentación preclínica. Ha sido cedida

MATERIAL Y METODOS

por la Dra. Gabriel, del Instituto de Investigación y Desarrollo Químico-Biológico, y es en este trabajo la primera vez que se estudia su efecto directamente sobre los canales de calcio. Posee dos ventajas en su manejo respecto a otras dihidropiridinas: es estable a temperatura ambiente y bajo luz normal en solventes acuosos (IQB, 1990) y es ligeramente soluble en agua. En nuestros experimentos se usó en un amplio rango (desde micromolar hasta 10^{-11} M). El fármaco se disolvió en etanol 30/70 (v/v) y se conservó a temperatura ambiente durante los experimentos.

En el estudio de la regulación metabólica de los canales de Ca^{2+} (apartado D de "RESULTADOS") se utilizaron ésteres de forbol como agentes estimulantes de la proteína quinasa C (Kaczmarek, 1987; Nishizuka, 1988), concretamente TPA (phorbol 12-myristate 13-Acetate, Sigma). Se preparó en stock $100\mu\text{M}$ y se preservó de la luz ya que es fotosensible. Esta sustancia es un promotor cancerígeno, por lo que se manejó con las debidas precauciones. La subunidad catalítica de la proteína quinasa A, purificada de músculo cardíaco bovino (Sigma) se reconstituyó en agua destilada que contenía 50mg/ml de dithiothreitol (DTT) para evitar la rápida pérdida de actividad. El DTT aplicado a las células glómicas de forma aislada no modificó el comportamiento de la corriente de Ca^{2+} . La proteína quinasa A es estable sólo durante 72 horas y no puede congelarse.

La dopamina (DA) y la noradrenalina (NA) son dos catecolaminas presentes en el cuerpo carotídeo (Fidone y González, 1986). En este trabajo se estudió la posible modulación de las corrientes iónicas por estos neurotransmisores. La dopamina se diluyó en agua destilada justo en el momento de ser aplicada a la célula en la solución externa ya que de esta forma se evita en lo posible su oxidación. Algunos autores emplean ácido ascórbico como antioxidante de la dopamina (Marchetti et al., 1986), pero en nuestro estudio esta sustancia aplicada a las células glómicas redujo rápida e irreversiblemente la corriente de Ca^{2+} , observándose además un deterioro celular importante (Fig. 2). La noradrenalina se utilizó a una

MATERIAL Y METODOS

concentración de $1\mu\text{M}$ y su esteroisomero (-) mostró un efecto bloqueante irreversible de la corriente de Ca^{2+} ([-]arterenol-bitartrate, Sigma), pero no lo hizo en su forma (\pm) (clorhidrato de (\pm) arterenol, Sigma) incluso a dosis diez veces más elevadas.

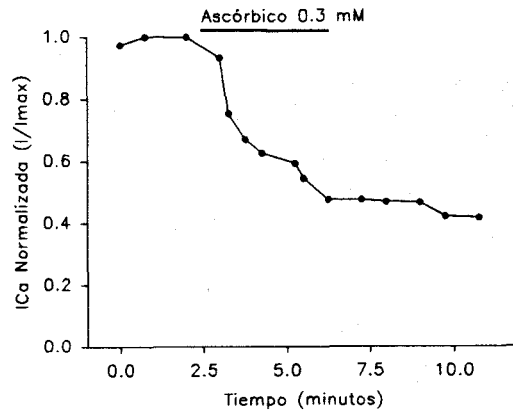


Figura 2. Efecto del ácido ascórbico (0.3mM) sobre la corriente de Ca^{2+} . Soluciones $10\text{Ca}/10\text{EGTA} + \text{ATP}$.

3. Técnicas de registro

En el presente trabajo se han estudiado las corrientes iónicas en células sometidas a fijación de voltaje aplicando la técnica de "patch-clamp" en su configuración "whole-cell" (Hamill et al., 1981). En algunos experimentos se realizaron registros en fijación de corriente ("current-clamp") para registrar variaciones en el potencial de membrana (potenciales de acción). El protocolo seguido para la obtención de las corrientes iónicas se detalla en el apartado 4. A continuación se describe el material utilizado y el diseño electrónico del mismo.

3.1 Descripción general

La técnica de "patch-clamp" tal y como ha empleado en este trabajo es una modificación de la descrita por Neher y Sakmann en 1976, y del "extracelular patch-clamp" (Neher et al., 1978) en la que Hamill et al., (1981) introdujeron varias mejoras. Con ellas se consigue disminuir el ruido del sistema en un orden de magnitud aumentando la resolución de la corriente registrada, y permite fijar el voltaje de la membrana usando un solo microelectrodo. La técnica permite además

MATERIAL Y METODOS

resolver corriente que fluye por canales únicos en un microárea de membrana. Básicamente la técnica consiste en acercar una pequeña pipeta de vidrio pulida a la membrana celular hasta contactar con ella, formándose un sello de alta resistencia (del orden de 5-10 G Ω) al aplicar una ligera presión negativa en el interior de la pipeta (unos 20 cm de agua). Esta configuración es estable y se denomina "cell attached" (Hamill et al., 1981). A partir de esta configuración es posible romper el pequeño área de membrana que separa el interior de la pipeta y el citosol manteniéndose el giga-sello, lo que proporciona un acceso de baja resistencia al interior celular.

El electrodo de vidrio se conecta mediante un hilo de plata clorurada la entrada del amplificador, unido a un micromanipulador motorizado (Newport Corp. USA) que permite su desplazamiento en los tres ejes del espacio con suma precisión. El control visual del electrodo y de las células se realizó con la ayuda de un microscopio invertido Nikon (mod. TMD Diaphot, Nippon K., NY) con óptica Nomarski, en cuya platina móvil se dispuso la cámara de registro. Esta cámara está construida en metacrilato, es de forma rectangular y tiene unos 300 μ l de capacidad. En ella se situaron los cubres de vidrio con las células adheridas (véase sección 1.3 "*Cultivo de las células*"). La solución externa fluye gracias a un sistema de perfusión continua con varias vías seleccionables que permite sustituir la solución de la cámara en pocos segundos. El control del flujo se regula por la altura a la que está el reservorio de la solución respecto de la cámara de registro. El medio extracelular se recoge por una bomba de aspiración en un recipiente a través de una aguja de succión, cuya altura regula el nivel de solución en la cámara.

El microscopio con el sistema arriba descrito se situó sobre una mesa antivibratoria (Micro-G, TMC, USA) cuya base está aislada del suelo por una cámara de aire a presión para evitar vibraciones mecánicas. Rodeando todo el

MATERIAL Y METODOS

dispositivo se colocó una jaula de Faraday conectada a tierra para aislar el registro de posibles interferencias eléctricas.

3.2. *Micropipetas de vidrio*

Las micropipetas utilizadas en el registro se fabricaron según el método de Hamill et al. (1981) a partir de capilares de hematocrito de vidrio blando (Hirschmann Laborgeräte, Alemania) en dos etapas sucesivas. La primera consiste en estirar el capilar por calentamiento en dos fases con un estirador vertical (David Kopf Instr. mod. 700D, USA) hasta obtener dos pipetas simétricas cuyos orificios dependerán del calor aplicado durante el estiramiento. La segunda etapa tiene como finalidad reducir el diámetro de la pipeta y hacer el orificio liso y suave para no dañar la membrana una vez se realiza el sello. Esto se consigue con una microforja construida a partir de un hilo de platino, instalada sobre un microscopio invertido (Nikon, mod. TMS). La intensidad eléctrica aplicada al hilo determina el grado de pulido del electrodo. El tamaño del orificio de las micropipetas se determinó midiendo la resistencia eléctrica de la punta. Las usadas en este trabajo, que fueron las más adecuadas para el registro en "whole-cell", tenían entre 2 y 3.5 M Ω . Las pipetas se rellenaron de solución interna filtrada justo antes de registrar las células.

3.3. *Diseño electrónico del sistema*

La estimulación, registro, adquisición, almacenamiento y análisis de las corrientes iónicas se llevó a cabo con un sistema basado en el diseño de Ureña et al., (1989a) donde todo el control se realiza desde un ordenador IBM PC/AT. Consta básicamente de:

- Amplificador de "patch-clamp"
- Ordenador IBM PC/AT, que incluye:

MATERIAL Y METODOS

- Generador de pulsos programable
- Sistema de adquisición de señales con un convertidor A/D
- Sistema de representación en pantalla con tres convertidores D/A
- Sistema de análisis de los datos mediante software
- Osciloscopio analógico

La figura 3, modificada de Ureña et al., (1989a) representa de forma gráfica este sistema. Dado que este diseño ha sido descrito con detalle en trabajos previos (Ureña et al, 1989a; Castellano, 1990) aquí se hace sólo un breve comentario del mismo.

El amplificador registra y acondiciona las señales generadas en la membrana celular. El usado en nuestro caso fue construido en nuestro laboratorio, aunque en algunas ocasiones se utilizó un equipo comercial (List EPC-7, List Medical Instrumens, Alemania) para el registro de potenciales de acción en modo "current-clamp". El amplificador consta básicamente de un "head-stage"

que se dispone cerca de la célula y donde un amplificador operacional de muy bajo ruido intrínseco (OP111, Burr Brown, USA) está configurado como convertidor corriente-voltaje con una resistencia de realimentación (R_f) de 100 M Ω . Las etapas de ganancia, compensación de la capacidad y de la resistencia en serie, filtrado y regulación del pulso se sitúan en una unidad aparte en un rack de 19". El ampli-

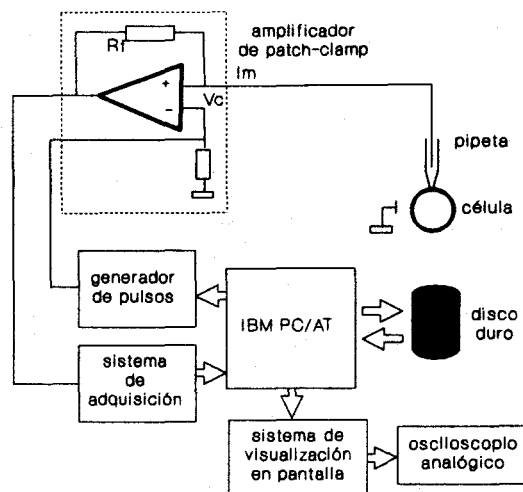


Figura 3. Esquema general del sistema de adquisición, análisis y almacenamiento de la señal. Modificado de Ureña et al (1989a)

MATERIAL Y METODOS

ficador permite multiplicar la señal con un sistema de ganancia ajustable, además de variar el valor con el que se mantiene el potencial de membrana de la célula ("holding potential").

La capacidad eléctrica originada por la pipeta (una vez introducida en la solución externa) y por el propio sistema, se canceló con una etapa de compensación incluida en el amplificador. Esta señal capacitativa coincide con el principio y el final del pulso cuadrado de potencial aplicado a la célula, y puede interferir el registro de las corrientes iónicas. Una vez compensada, al establecer la configuración "whole-cell" y acceder al interior celular, se registra de nuevo un transiente de capacidad debido al efecto capacitativo de la membrana. La medida del área que queda por debajo de la curva es proporcional a la carga eléctrica que atraviesa la membrana, y en este trabajo se aprovechó para calcular indirectamente la superficie celular (para mayor detalle véase apartado A de "RESULTADOS"). La figura 4 presenta más adelante un registro de capacidad y su cancelación para obtener el componente resistivo iónico aislado.

El generador de pulsos programable está situado en una tarjeta prototipo dentro del microordenador y se emplea para generar un potencial de membrana artificial modificable con el que se activan los canales iónicos dependientes de voltaje. El generador permite utilizar hasta 8 protocolos de estímulos diferentes, desde un pulso de voltaje cuadrado simple hasta prepulsos complejos de duración y amplitud variable que se generan automáticamente. El rango de amplitud de los pulsos está comprendido entre -250 y +250 mV, y el de duración de 0.1 a 1000 milisegundos. Otra posibilidad es sustraer linealmente los componentes capacitativos y de corriente de fuga, lo que se consigue con pulsos repetidos de polaridad opuesta al de estímulo (0, 2 o 4), de igual duración pero de amplitud 2 o 4 veces menor (Bezanilla y Armstrong, 1977; Ureña et al, 1989a). Todo el control del generador se realiza mediante software desde el ordenador.

MATERIAL Y METODOS

La unidad de adquisición se basa en un convertidor analógico-digital de 12 bits (AD578, Analog Devices, USA), un amplificador "sample & hold" (AD346, Analog Devices) y una Interfase Periférica Programable (PPI 8255A-5, Intel) disparada por cuatro monoestables (74121, Texas Instruments; Ureña et al., 1989a). La construcción y puesta a punto de este sistema de adquisición y de la unidad de representación en pantalla fue parte del presente trabajo. El sistema permite la conversión rápida de la señal analógica a la entrada del amplificador de "patch-clamp" en otra digital de 500 puntos con una frecuencia de muestreo máxima de 100 MHz cuando la frecuencia de reloj del microprocesador es de 12 MHz. El programa permite adquirir a diferentes frecuencias que se ajustaron a intervalos de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 microsegundos entre puntos. La transferencia de la señal digital a memoria RAM se realizó por instrucciones en Macroassembler, incluidas como subrutinas dentro del programa de adquisición y análisis, escrito en Basic (Ureña et al, 1989a). El registro, una vez visualizado en el osciloscopio, se puede transferir opcionalmente de la memoria RAM a un disco duro para su almacenamiento y análisis posterior.

La unidad de representación gráfica se diseñó para visualizar en un osciloscopio analógico los 500 puntos de la señal digitalizada. Dispone de dos canales de salida analógica con los que se puede analizar y comparar simultáneamente dos registros diferentes. Consta de un decodificador-multiplexor (74LS124, Texas Instruments) y dos convertidores digitales-analógicos de 12 bits (AD565AK, Analog Devices). Un tercer convertidor D/A es utilizado para generar una señal de rampa que dispara la deflexión horizontal del osciloscopio, que está conectado en modo X/Y.

4. Proceder experimental

Los experimentos se iniciaron trasladando un cubre de vidrio (con las células adheridas a él) desde el incubador hasta la cámara de registro, por donde fluye la solución externa. En contacto con esta solución se colocó el electrodo de referencia, formado por un hilo de plata clorurada. A continuación se insertó la pipeta de vidrio llena de solución interna en el portaelectrodos del "head-stage", donde un alambre de plata clorurada conectado a la entrada (-) del amplificador operacional (Fig. 3) entra en contacto con la solución interna. Accionando el micromanipulador se aproxima el electrodo a la célula bajo control visual con el microscopio. Una vez que la pipeta contacta con el medio externo se mide su resistencia eléctrica aplicando un pulso cuadrado de 2 ms y 10 mV continuamente a la entrada (+) del amplificador operacional. El voltaje que aparece a la salida del amplificador es inversamente proporcional a la resistencia del electrodo, que a su vez es indicativa del tamaño del orificio de la pipeta. La resistencia de la pipeta (R_p) se calcula por la fórmula:

$$R_p = \frac{V_c \cdot R_f}{V_o - V_c} \quad (1)$$

donde V_c es el pulso de potencial aplicado (10 mV en este caso), R_f es el valor de la resistencia de realimentación (100 M Ω) del convertidor corriente-voltaje y V_o es el voltaje a la salida del amplificador.

Al aproximar la pipeta a la célula y contactar con la membrana se observa un brusco aumento de resistencia. Este proceso se controla con ayuda del osciloscopio, y en este momento se aplica una suave presión negativa en el interior de la pipeta mediante succión, consiguiéndose un sello de alta resistencia del orden de 5-10 G Ω (Fig. 4A). Succionando de nuevo se rompe el pequeño área de membrana que separa el contenido de la pipeta y el citosol, estableciéndose el modo "whole-cell". En este momento se registra en el osciloscopio un doble transiente

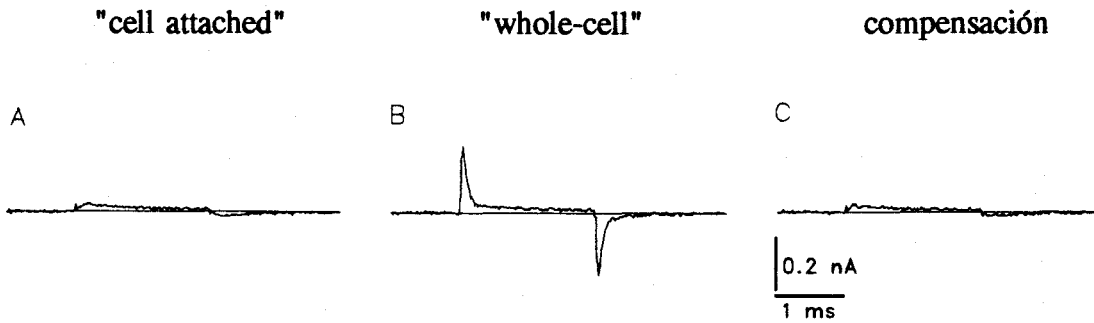


Figura 4. Registro de capacidad y cancelación de la misma al acceder al modo "whole-cell". Capacidad de la célula, 5.35pF.

capacitativo (Fig.4B) que coincide con el principio y el final del pulso de estimulación que se cancela electrónicamente como se indicó más arriba (Fig. 4C). Esta configuración supone un acceso de baja resistencia al interior celular y permite el registro de corrientes iónicas generadas en toda la membrana plasmática, así como la fijación del potencial celular al valor deseado ("holding potential") en células pequeñas. A partir de este momento se comienza el registro empleando los protocolos del programa de adquisición y con la posibilidad de utilizar la sustracción lineal antes comentada.

5. Análisis de los resultados

5.1 Tratamiento de la señal

Los registros adquiridos mediante el diseño descrito previamente se visualizan en la pantalla del osciloscopio, lo que permite su análisis y comparación con otros registros. Entre las posibilidades que ofrece el sistema se incluye la determinación de la línea de base, la medida de los parámetros de la señal, el cálculo del área bajo la curva de la corriente, el filtrado digital de la señal y su ajuste por expresiones matemáticas. Todos estos procesos se realizan desde el ordenador mediante un

MATERIAL Y METODOS

programa específico a través de tres cursores que, situados en los lugares adecuados, permiten realizar las diferentes funciones disponibles.

La determinación de la línea de base fue una de las operaciones más empleadas, ya que es la referencia necesaria para medir la amplitud de la corriente y sobre la que se ajustan las funciones matemáticas. Otra medida muy utilizada y tomada en la mayoría de las células registradas (236 de 328) fue el cálculo de la capacidad de la membrana, cuyos resultados se presentan en el apartado A de "RESULTADOS" Por otro lado, la señal se filtró cuando se consideró necesario con un algoritmo que se comporta como filtro paso bajo, con una frecuencia de corte de ≈ 3 kHz y con la posibilidad de filtrar segmentos seleccionados de la señal.

5.2 Ajuste matemático de los datos y estadística

La cinética de los canales iónicos (activación, deactivación, inactivación), sigue un curso temporal que puede ajustarse matemáticamente. En el caso de los canales de Ca^{2+} la función que más se aproxima al comportamiento cinético es la exponencial simple o la suma de varias exponenciales. Dentro del apartado A de "RESULTADOS" se muestra el análisis matemático de la cinética de activación, inactivación y cierre. En cada una de ellas se indica la constante de tiempo (τ) de la función exponencial a la que se ajustan (en la cinética de activación se calculó el tiempo medio de activación en lugar de τ). El método empleado para el cálculo de la expresión matemática fue el de los mínimos cuadrados, y en nuestro caso se llevó a cabo desde un programa de análisis y gráficos (Sigmaplot 4.0, Jandel Corp. USA). De igual forma los valores de las curvas conductancia-voltaje (Fig. 11 en "RESULTADOS") se ajustaron a una ecuación de Boltzmann con el mismo programa. El análisis estadístico de los datos experimentales consistió en la media y desviación estándar, expresados como media \pm DE a lo largo del texto, calculados también desde Sigmaplot.

5.3 *Diseño y presentación gráfica*

El presente texto se redactó utilizando la versión 5.1 de Wordperfect (Wordperfect Corp., USA), aunque parte del trabajo se realizó con Microsoft Word versión 4.0 y se importó posteriormente desde Wordperfect.

El programa de análisis del sistema de adquisición contempla la opción de exportar los registros de corrientes iónicas como ficheros en formato ASCII. Este formato es reconocido por Sigmaplot y permite importar de forma rápida y eficaz los registros experimentales, por lo que la mayoría de las gráficas se diseñaron con este programa. Las ilustraciones y algunas figuras de resultados se han realizado con Harvard Graphics versión 2.3 (Software Publishing Corp., USA). Todos los programas utilizados se ejecutaron con un ordenador compatible 386sx (ADL Computers, España) y para la impresión de las gráficas y el texto se empleó una impresora Laserjet III con lenguaje Postscript (Hewlett Packard, USA).

Las imágenes fotográficas se tomaron directamente del microscopio invertido con una cámara Nikon F-1 cargada con película de diapositivas Ektachrome 400 (Kodak). EL positivado a papel se consiguió con un kit Cibachorme A (Ilford, Gran Bretaña) en nuestro propio laboratorio fotográfico.

RESULTADOS

A) LAS CELULAS GLOMICAS SON EXCITABLES Y GENERAN POTENCIALES DE ACCION CON UN COMPONENTE DE CALCIO.

El presente trabajo trata sobre el estudio de las corrientes de Ca^{2+} registradas en células tipo I del cuerpo carotídeo de conejo dispersas y mantenidas en cultivo primario, aplicando la técnica de "patch-clamp" en el modo "whole-cell" (ver "MATERIAL Y METODOS"). El hecho de que las células glómicas sean pequeñas y redondeadas permite aplicar esta técnica con gran fidelidad (Hamill et al., 1981). De un total de 328 células registradas se consideraron adecuadas para el análisis 236 (72%) por su estabilidad y por la calidad del registro.

Los experimentos se realizaron en células que llevaban entre 2-3 horas o varios días en cultivo, no apreciándose diferencia significativa entre los datos obtenidos de unas y otras, excepto que la amplitud de la corriente de Ca^{2+} registrada parece disminuir conforme se alarga el tiempo tras la dispersión. Tampoco se observó un cambio aparente en las corrientes iónicas de células procedentes de cuerpos carotídeos que habían sido denervados crónicamente. Las preparaciones celulares utilizadas no superaban los 4 días de cultivo, aunque en ciertos casos se han mantenido viables hasta 10 días. El tiempo medio de experimentación por célula

fue de 25 minutos, pero cuando fue necesario se realizaron registros estables durante más de 100 minutos.

1. Propiedades eléctricas pasivas

En los inicios de nuestro protocolo experimental se midieron en un número de células las propiedades eléctricas pasivas de la membrana para determinar la calidad del registro y para estimar parámetros relacionados con el tamaño de las células. La capacidad eléctrica permite medir de forma indirecta la superficie de la célula (considerándola como una esfera perfecta) y se basa en el comportamiento como dieléctrico de la bicapa lipídica de la membrana, que se dispone separando dos soluciones iónicas cargadas. Según la expresión

$$C = \frac{Q}{V} \quad (2)$$

se puede calcular en una célula en la configuración de "whole-cell" la capacidad C midiendo la cantidad de carga eléctrica Q obtenida al aplicar un pulso de potencial V . El valor de Q se obtiene integrando el área ocupada por la corriente capacitativa (ver Fig. 4 en "MATERIAL Y METODOS"). El valor de capacidad estimado es de 5.0 ± 1.6 pF (media \pm DE; $n=201$), lo que considerando que las membranas biológicas tienen una capacidad específica de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Cole, 1968), resulta en un diámetro promedio para las células tipo I de $12.61 \mu\text{m}$. Este valor se corresponde con las medidas realizadas al microscopio óptico.

La resistencia de entrada es un parámetro que depende de la resistencia del sello y de la conductancia de la membrana celular (ver "MATERIAL Y METODOS"). Cuando se realizan sellos de alta resistencia (del orden de $G\Omega$), la resistencia de la membrana se puede estimar aplicando a ésta un pulso de potencial

RESULTADOS

negativo (generalmente desde -80 a -120 mV) de varios ms de duración mediante la relación:

$$R = \frac{V}{I} \quad (3)$$

donde **I** es la amplitud de la corriente que se registra y **R** la resistencia de la membrana en reposo (que equivale al valor inverso de la conductancia). En nuestra preparación la resistencia de entrada estimada en células tipo I fue de $1.9 \pm 0.93 \times 10^9 \Omega$ (media \pm DE; n=29). Asumiendo una forma celular esférica y considerando un radio medio de $6.31 \mu\text{m}$, se obtiene una resistencia específica de membrana de $9.47 \text{ K}\Omega \cdot \text{cm}^2$.

2. Corrientes iónicas totales registradas con la técnica de "patch-clamp" en la configuración "whole-cell"

En fecha reciente se ha mostrado que las células glómicas poseen diferentes tipos de canales iónicos dependientes de potencial específicos para Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y por lo tanto generan corrientes iónicas al ser estimuladas con pulsos despolarizantes desde un potencial fijado similar al de reposo (Duchen et al., 1988; López-Barneo et al., 1988). Ejemplos ilustrativos de los componentes más importantes de la corriente iónica que se genera en las células de nuestra preparación se muestran en la figura 5 mediante barridos obtenidos al aplicar pulsos de potencial (durante el tiempo indicado por las flechas) desde -80 a +20 mV de duración variable (6, 20, 40 y 450 ms en A, B, C y D, respectivamente). En el trazado A se observa un componente inicial rápido de corriente hacia el interior de la célula seguido de otro de sentido contrario y con un curso temporal más lento, que se interrumpe al finalizar el pulso; en la repolarización aparece un tercer componente muy rápido de corriente entrante transitoria que alcanza un pico máximo y tras un periodo de relajación alcanza el nivel de corriente inicial.

RESULTADOS

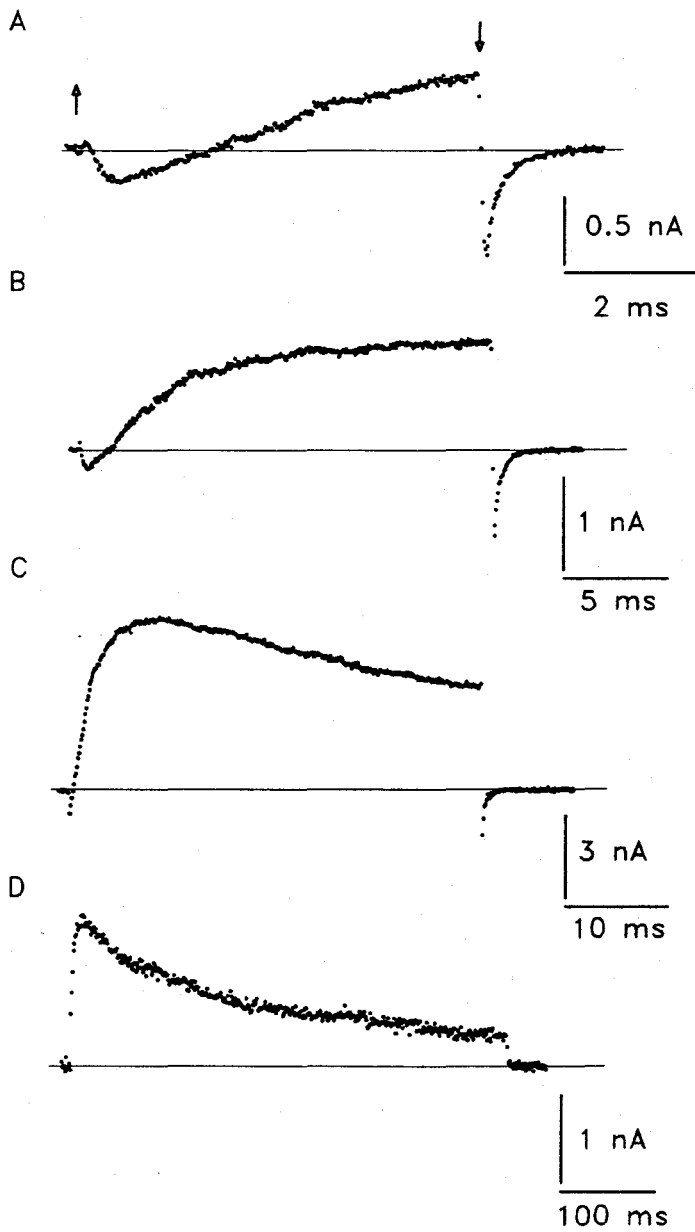


Figura 5. Corrientes iónicas totales en células glómicas generadas aplicando un pulso de potencial desde -80 mV hasta +20 mV de duración variable (6, 20, 50 y 100 ms: A, B, C y D respectivamente. Soluciones: 10 Ca//130K.

RESULTADOS

Los barridos **B**, **C** y **D** son registros obtenidos en las mismas condiciones experimentales pero con diferente resolución temporal. En ellos se aprecia que con pulsos de larga duración el componente mayoritario es el de corriente hacia el exterior y que este componente de la corriente tras alcanzar un máximo (que es estable sólo durante unos pocos ms; **B**) se inactiva (**C** y **D**). Como se muestra más adelante, esta corriente se debe a la activación de canales específicos para K^+ y la salida de estos iones desde el citosol hacia el espacio extracelular movidos por su gradiente electroquímico. También se muestra más adelante que la corriente entrante inicial y la que se genera tras la repolarización se deben a la actividad de canales de Na^+ y de Ca^{2+} .

3. Potenciales de acción en células glómicas

Debido a la existencia de canales iónicos dependientes de potencial las células glómicas son excitables y pueden generar potenciales de acción de 120 a 140 mV de amplitud (Duchen et al., 1988; Ureña et al., 1989b). En estudios electrofisiológicos previos realizados mediante el registro intracelular con micropipetas de vidrio (Acker y Pietruschka, 1977; Eyzaguirre et al., 1983) las células tipo I se consideraron no excitables. Sin embargo estos datos no pueden considerarse como definitivos ya que, debido posiblemente a la dificultad técnica que impone el tamaño de las células, el potencial de membrana promedio obtenido en estos estudios (-20 mV) es suficientemente bajo como para producir una inactivación completa de todas las conductancias iónicas. Como se muestra en la figura 6, los potenciales de acción de las células glómicas se pueden registrar con fidelidad durante el registro en "whole-cell" pasando de la configuración electrónica de "voltage-clamp" a "current-clamp" ("V-clamp off" en la figura). Los potenciales de acción se generan de forma repetitiva y sus parámetros (duración, amplitud, etc.) varían de célula a célula en función de la amplitud relativa de las diferentes corrientes iónicas (López-López et al., 1989). Mediante la inhibición de un canal de K^+ sensible a la

RESULTADOS

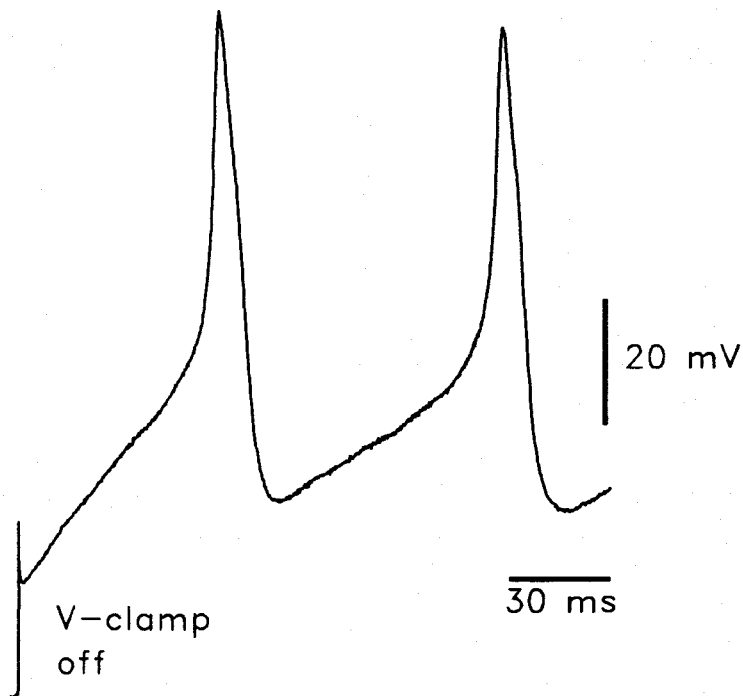


Figura 6. Potenciales de acción espontáneos de células glómicas registrados en la configuración "whole-cell" pasando del modo "voltage-clamp" a "current-clamp" (V-clamp-off en la figura). Soluciones 10Ca//130K.

presión parcial de oxígeno (López-Barneo et al., 1988; Delpiano y Hescheler, 1989; Ganfornina y López-Barneo, 1991) las células glómicas responden a la hipoxia con un aumento en la frecuencia de los potenciales de acción, lo que conlleva un incremento en la entrada de Ca^{2+} al citosol y la liberación de dopamina y otros transmisores por exocitosis (Fishman et al., 1985; Obeso et al., 1987; López-López et al., 1989). Como se comentó en "INTRODUCCION" los transmisores liberados por las células glómicas activan a fibras nerviosas aferentes que actúan sobre neuronas respiratorias centrales para producir hiperventilación (ver Fitzgerald y Lahiri, 1986; Fidone y González, 1986). Los canales de Ca^{2+} de las células tipo I,

que se activan durante cada potencial de acción, representan por lo tanto el eslabón que une el mecanismo sensor de O_2 y la secreción celular.

4. Aislamiento experimental de la corriente de calcio

Como se indicó anteriormente, la membrana de las células tipo I, como la mayoría de las membranas excitables, contiene canales para las diferentes especies iónicas y por lo tanto el estudio de un tipo de corriente requiere su disección del resto de los componentes. En nuestros experimentos la corriente de Ca^{2+} se aisló utilizando bloqueantes específicos de canales iónicos y sustituyendo los iones permeabilizantes por otros que no lo son. El proceder seguido se ilustra en la figura 7. El trazado A es un registro de los tres componentes de la corriente iónica completa (de Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) obtenido durante una despolarización de 6 ms hasta +20 mV. La corriente saliente, debida al movimiento de K^+ más concentrado en el líquido intracelular, se abole cuando el K^+ interno se sustituye equimolarmente por Cs^+ (B), que es un catión que no permeabiliza por los canales de K^+ (Adelman y Senft, 1966; Bezanilla y Armstrong, 1972). En esta situación el mismo protocolo experimental produce la génesis de corriente hacia el citosol. Esta corriente tiene un curso temporal complejo ya que se debe a la activación tanto de canales de Ca^{2+} como de Na^+ y al movimiento de ambas especies iónicas, más concentradas en el medio extracelular. El componente rápido de la corriente entrante desaparece en presencia de 1 μM tetrodotoxina (C), que es un bloqueante muy específico de los canales de Na^+ (Narahashi et al., 1964), dejando en completo aislamiento el componente de corriente debido a la actividad de canales de Ca^{2+} . Como se muestra más adelante la corriente de Ca^{2+} se caracteriza además porque aumenta en amplitud al sustituir el Ca^{2+} externo por Ba^{2+} (Hagiwara et al., 1975) y se bloquea en presencia de concentraciones mM de Mg^{2+} , Cd^{2+} o Co^{2+} en el medio extracelular (Kohlradt et al., 1972).

RESULTADOS

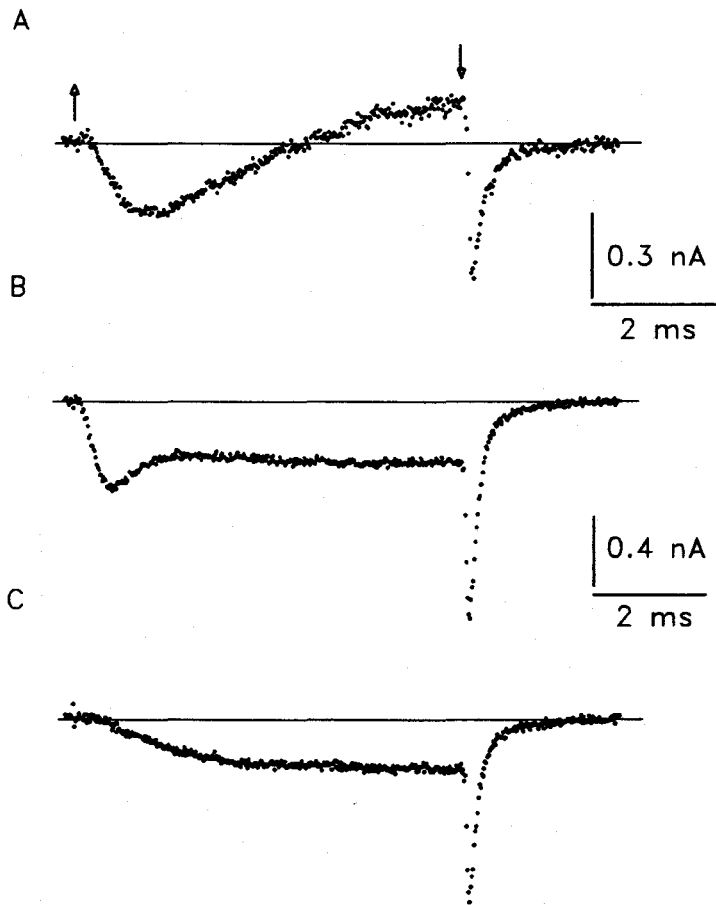


Figura 7. Aislamiento experimental de la corriente de Ca^{2+} . A, corrientes iónicas totales con los tres componentes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} al aplicar un pulso de potencial desde -80 mV a $+20$ mV de 6 ms de duración (el inicio y el final del pulso viene indicado por las flechas). Soluciones 10Ca//130K. B, se ha abolido el componente de K^+ sustituyendo equimolarmente el K^+ interno por Cs^+ . Soluciones 10Ca//130Cs. C, desaparición del componente rápido de corriente entrante al añadir $1 \mu\text{M}$ tetrodotoxina en la solución externa, quedando aislado el componente de Ca^{2+} . Soluciones 10Ca//130Cs. B y C son registros de la misma célula.

B) LAS CELULAS GLOMICAS TIENEN UNA POBLACION HOMOGENEA DE CANALES DE CALCIO DE ALTO UMBRAL.

Aunque los canales de Ca^{2+} están ampliamente distribuidos en diferentes especies y tipos celulares, en los últimos años se ha mostrado que existen diferentes tipos de canales de Ca^{2+} , que posiblemente cumplen funciones fisiológicas distintas, los cuales se pueden distinguir por sus características cinéticas y farmacológicas (Armstrong y Matteson, 1985; Fox et al., 1987; Miller, 1987; Tsien et al., 1988; Bean, 1989). En esta sección se presentan las propiedades biofísicas fundamentales de la corriente de Ca^{2+} de las células glómicas y se muestra que dicha corriente se debe a la actividad de una población casi homogénea de canales de Ca^{2+} de umbral alto y del tipo L.

1. Relación corriente-voltaje

La corriente de Ca^{2+} (I_{Ca}) es función del campo eléctrico transmembranario, ya que de éste dependen el número de canales activados y el gradiente electroquímico para los iones Ca^{2+} . La relación entre I_{Ca} y el potencial de membrana se ilustra en la figura 8. Los registros de la parte izquierda (A) corresponden a una familia de corrientes de Ca^{2+} generadas por pulsos que desde un valor de -80 mV desplazan el potencial de membrana a los valores indicados junto a cada trazado. Las flechas indican el inicio y el final de los pulsos de potencial. La corriente comienza a observarse a partir de -20 mV, incrementa en amplitud con despolarizaciones hasta +20 mV y posteriormente disminuye conforme decrece el valor del gradiente electroquímico para Ca^{2+} . La relación entre el valor de la corriente (I), medida al final de cada pulso, y el potencial de membrana (V_M) que se alcanza con cada despolarización se representa en la figura 8B. La curva que une los puntos obtenidos experimentalmente muestra que el umbral de activación ocurre a ≈ -30 mV y que la corriente máxima se alcanza a +20 mV.

RESULTADOS

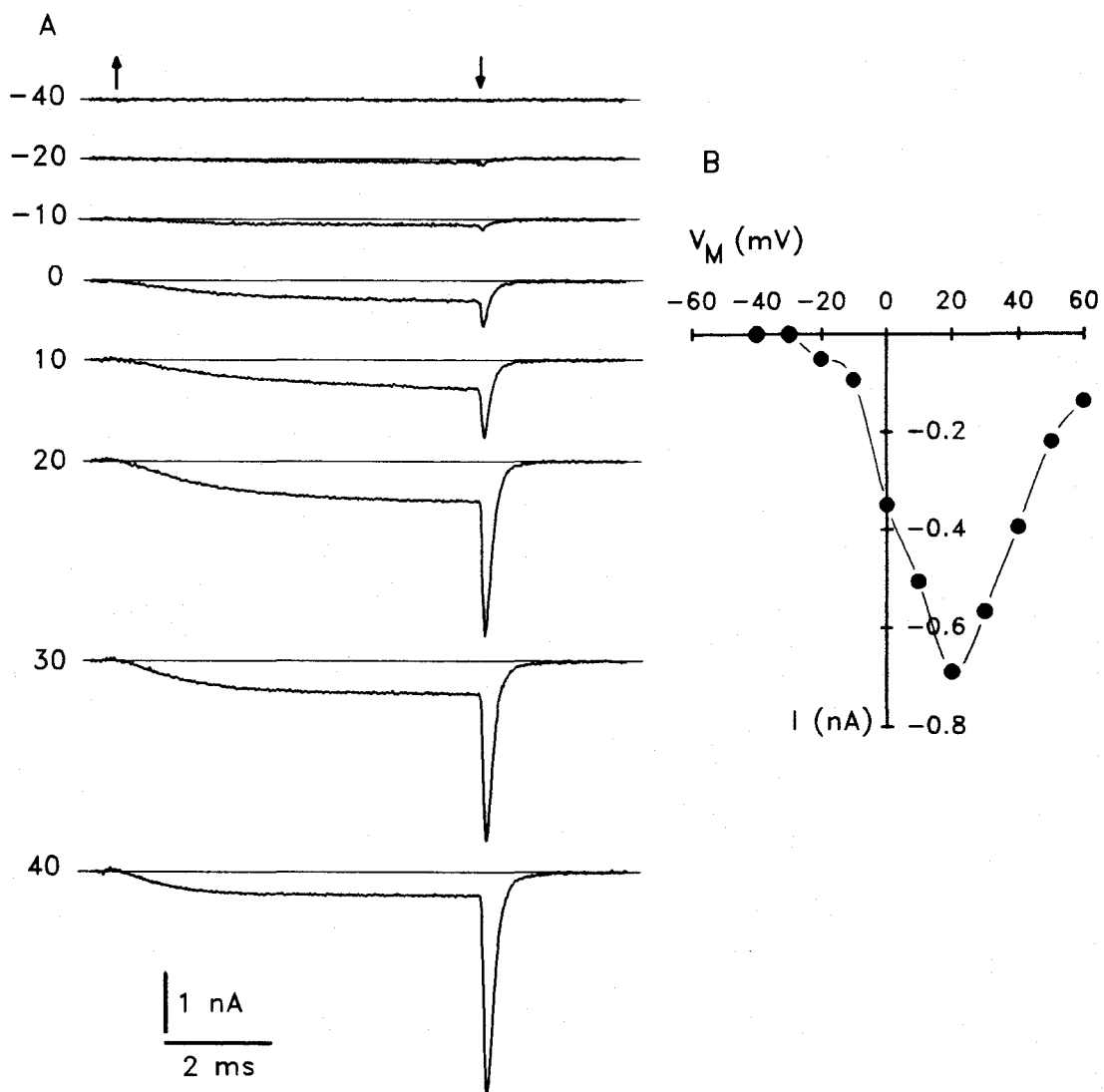


Figura 8. A, familia de corrientes de calcio registradas al despolarizar la célula con pulsos desde -80 mV a los valores indicados al comienzo de cada registro y de 7 ms de duración. B, relación corriente-voltaje obtenida de los registros de A midiendo la amplitud de la corriente al final del pulso en función del potencial aplicado en cada trazado. Soluciones 10Ca//110Cs, 20F.

RESULTADOS

Los registros de la figura 8A también muestran que en el instante de la repolarización a -80 mV (indicado por la flecha hacia abajo) aparece un componente de corriente hacia el citosol muy rápido y transitorio. Este componente de la corriente de Ca^{2+} (que se denomina corriente de cierre o "tail current") se debe al aumento brusco del gradiente electroquímico para el Ca^{2+} , que permeabiliza por los canales que se abrieron durante la despolarización y que en este instante permanecen abiertos. La amplitud de la corriente de cierre aumenta con despolarizaciones progresivamente superiores ya que el número de canales abiertos también es mayor. El cierre de los canales de Ca^{2+} a potenciales de membrana negativos es un proceso que requiere un tiempo, que aunque medible es corto, y por esta razón la corriente de cierre decrece rápidamente. La relajación de la corriente de cierre depende por lo tanto de la cinética de deactivación (o cierre) de los canales de Ca^{2+} , que es un proceso dependiente del potencial de membrana.

En la figura 9A se muestra la relación entre el potencial de membrana y la corriente obtenida al final de un pulso de 7 ms. Los puntos representan la media (\pm DE) de los valores obtenidos experimentalmente en 13 células. La curva que une estos puntos presenta unas características similares a las descritas en la figura 8B. La corriente aparece a ≈ -30 mV y aumenta de amplitud conforme se despolariza la membrana hasta alcanzar un pico máximo a $\approx +20$ mV, disminuyendo progresivamente a partir de este valor. Las medidas de amplitud de la corriente de Ca^{2+} muestran una gran dispersión debido a que este parámetro varía de célula a célula. De hecho, reagrupando los valores de amplitud en dos categorías se pueden distinguir dos poblaciones celulares: un grupo de corriente pequeña (máximo 0.45 nA; $n=6$) y otro de mayor amplitud de corriente (máximo sobre 0.8 nA; $n=7$, Fig. 9B). En ambos grupos celulares la forma de la relación corriente-voltaje es idéntica. Dado que no se apreciaron diferencias significativas en el tamaño de las células estudiadas que pudiese justificar la diferente magnitud de la corriente de Ca^{2+} , este hecho podría explicarse si la densidad de canales de Ca^{2+} es distinta en los dos

RESULTADOS

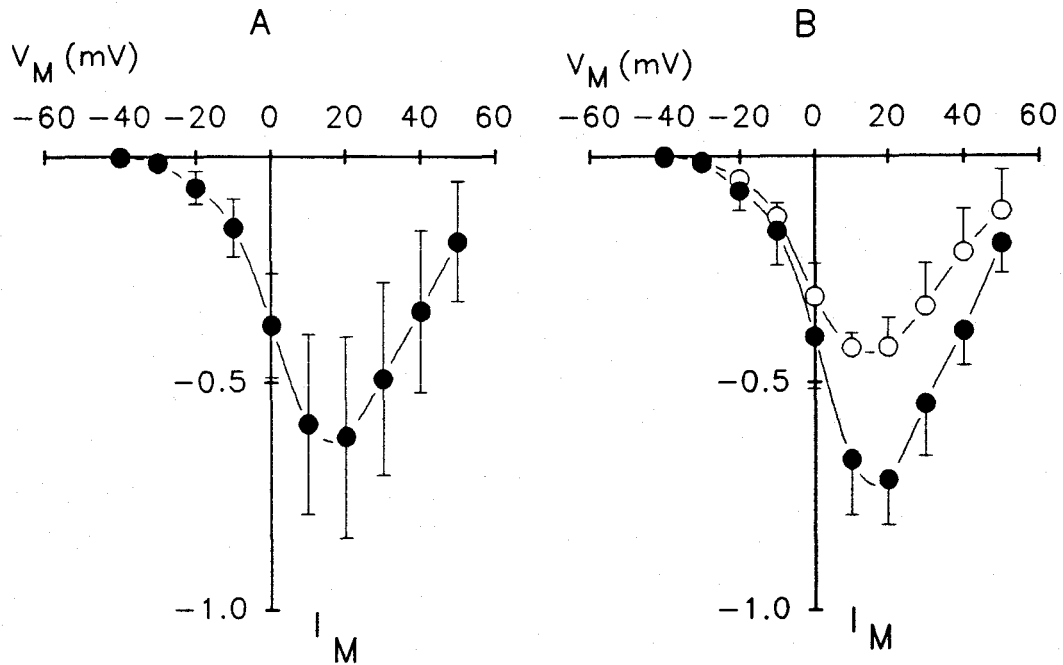


Figura 9. A, relación entre potencial de membrana y corriente medida al final de un pulso de 7 ms. Los valores son media de 13 células y las barras indican la desviación estándar de la media. B, los valores de amplitud de corriente de la gráfica A se han reagrupado en dos poblaciones con menor desviación de los datos: círculos blancos, grupo de células con corriente de gran amplitud, y círculos negros células con corriente de menor amplitud. La amplitud de corriente se indica en nA. Soluciones 10Ca//110Cs20F.

grupos de células. Estos datos coinciden además con la descripción previa de dos tipos de potenciales de acción en células glómicas, rápidos y lentos, que se deben a la variabilidad en la magnitud relativa de la conductancia para Ca^{2+} (G_{Ca}). Los potenciales de acción rápidos aparecen en células con una densidad baja de canales de Ca^{2+} y donde la conductancia despolarizante que predomina se debe a la activación de canales de Na^+ , mientras que los potenciales de acción de menor amplitud y curso temporal más lento se observan en células donde predomina G_{Ca} (López-López et al., 1989).

2. Cinética de activación

Como ocurre en otras corrientes iónicas, la activación de la corriente de Ca^{2+} es un proceso que depende del potencial de membrana y que sigue un curso temporal característico. Este curso temporal viene dado por la cinética de activación, que representa la rapidez con que se alcanza el nivel máximo de corriente una vez que se produce el cambio brusco de potencial. La cinética de activación se cuantificó midiendo el tiempo medio de activación ($t^{1/2}$), que es el tiempo que transcurre desde el comienzo de la despolarización hasta que se alcanza la mitad de la corriente máxima durante el pulso, en función del potencial de membrana (V_M , Fig. 10A). El valor de $t^{1/2}$ en función del V_M se representa gráficamente en la Fig. 10B, donde se observa que este parámetro decrece progresivamente (la activación es más rápida) cuanto mayor es la amplitud del pulso despolarizante.

RESULTADOS

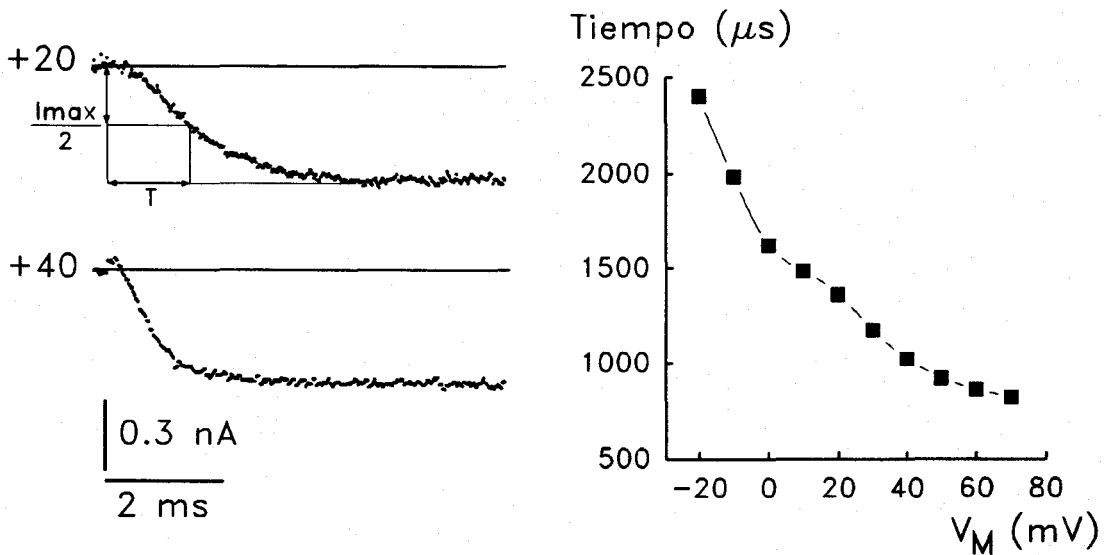


Figura 10. Cinética de activación. A, fase de activación de la corriente de Ca^{2+} a dos pulsos de potencial (+20 y +40 mV). T es el tiempo medio de activación ($t_{1/2}$) y representa el tiempo que transcurre desde el inicio del pulso hasta que la corriente alcanza la mitad de la amplitud máxima. B, tiempo medio de activación ($t_{1/2}$) en función del potencial de membrana. HP = -80 mV. Soluciones, 10Ca//110Cs, 20F.

El grado de activación de la conductancia para Ca^{2+} en función del potencial de membrana se obtuvo midiendo la amplitud de la corriente de cierre que, como se explicó anteriormente, es proporcional al número de canales que están abiertos al final del pulso despolarizante. En la figura 11A se muestra la dependencia de voltaje de la conductancia para calcio (medida como la amplitud de la corriente de cierre normalizada en relación al valor máximo). Los datos obtenidos (círculos blancos) se ajustan a una distribución de Boltzmann (línea continua) de la forma:

RESULTADOS

$$G_{Ca} = 1 - \frac{1}{1 + e^{\frac{V_M - V_{1/2}}{P}}} \quad (4)$$

donde $V_{1/2}$ y P son valores obtenidos del ajuste. $V_{1/2}$ es el valor de V_M al que G_{Ca} tiene el 50% de su valor (+5.8 mV) y P es una constante que depende de la pendiente de la curva y que indica la sensibilidad al voltaje de G_{Ca} . El valor de P puede también estimarse mediante la representación semilogarítmica de los valores de la conductancia (Fig. 11B). La línea sobre los círculos claros en la figura 11B muestra que G_{Ca} aumenta e -veces por cada 7.45 mV. La pendiente P es:

$$P = \frac{k \cdot T}{z \cdot e} \quad (5)$$

donde z es la valencia de la carga que se mueve durante la activación de un canal ("gating charge"), k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en grados Kelvin y e es la unidad electrostática de carga. A 25 °C, $KT/e = \approx 24$ mV (Hille, 1984) por lo que resulta que la cantidad de "gating charge" z necesaria para activar un canal de Ca^{2+} es equivalente a 3 cargas elementales. La activación de la corriente de Ca^{2+} es por lo tanto compatible con un modelo m^3 (Hodgkin y Huxley, 1952) que cinéticamente equivale a la existencia de tres estados cerrados y donde la transición entre diferentes estados implica el movimiento de una de las 3 cargas elementales que participan en el proceso de activación. Como se discute más adelante (ver apartado 5 "Modificación de la corriente por Ba^{2+} ") los parámetros cinéticos de la corriente de Ca^{2+} dependen del ión que permeabiliza por cada canal.

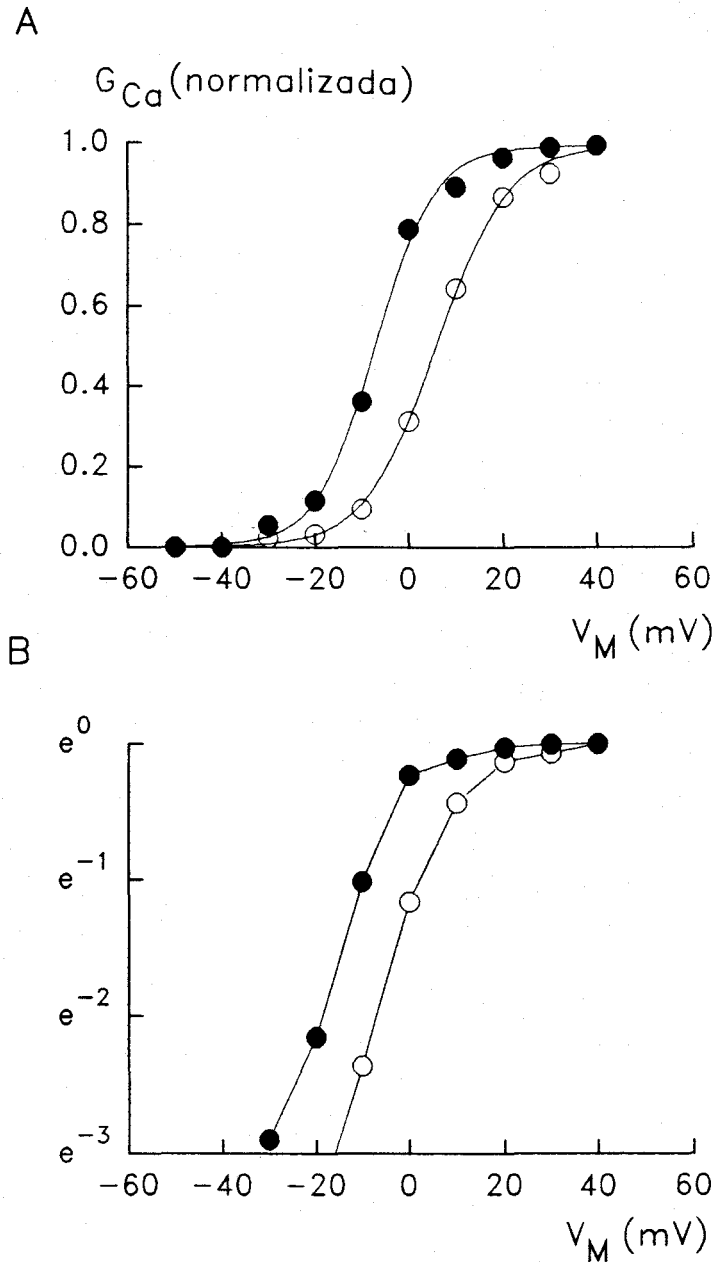


Figura 11. Relación conductancia-voltaje. En A, la amplitud de la corriente de cierre normalizada representa la conductancia para calcio (círculos claros) y bario (círculos oscuros) en función del potencial de membrana, que se ajustó a una distribución de Boltzmann (línea sigmoide). B, representación semilogarítmica de la curva conductancia-voltaje, donde se observa la relación lineal de la conductancia a valores de potencial negativo. La pendiente P de la recta es 7.45 mV/e para calcio (círculos claros) y 6.30 mV/e para bario. Explicación en el texto.

3. Cinética de cierre

El cierre de los canales de Ca^{2+} es, como la activación, un proceso que depende del potencial de membrana. Como se comentó anteriormente el curso temporal de la corriente de cierre refleja la cinética de deactivación de los canales de Ca^{2+} . En nuestro trabajo este parámetro se estudió analizando la corriente de cierre tras pulsos despolarizantes de 7 ms a diferentes potenciales de membrana y manteniendo el nivel de repolarización a -80 mV. La figura 12 muestra que la "tail current" puede ajustarse de forma casi perfecta por una función exponencial, que en el ejemplo de la figura tiene una constante de tiempo de 141 μs . Este hecho se debe

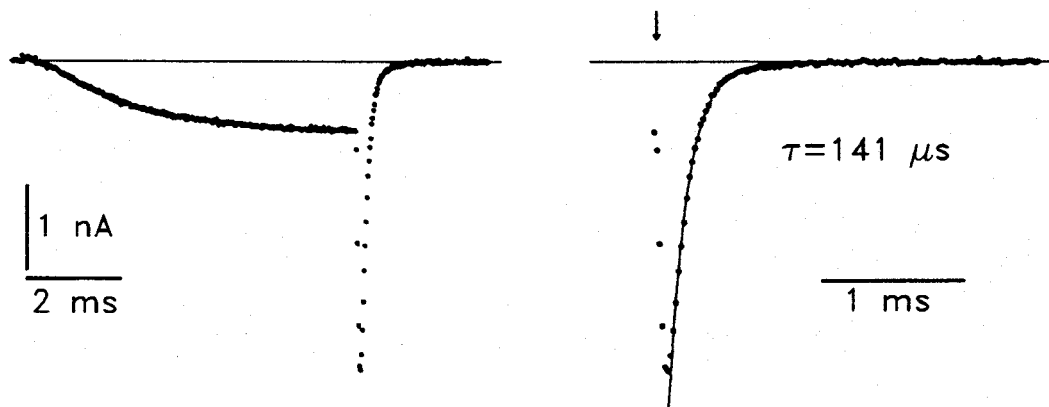


Figura 12. Registro de corriente de Ca^{2+} generada por un pulso de 7 ms a 0 mV desde un HP=-80 mV (izquierda) y ajuste de la corriente de cierre a una función exponencial sencilla (derecha). Constante de tiempo (τ), 141 μs . Soluciones 10Ca//130Cs. Temperatura, 22 °C.

a que el paso de los canales del estado abierto al cerrado sigue una cinética de primer orden y que para cerrar el poro de conducción basta con el movimiento a su

RESULTADOS

lugar original de una de las partículas que se movieron durante el proceso de activación. El curso temporal de la deactivación por tanto es rápido y su análisis en un total de 99 células dio como resultado una $\tau = 162.6 \pm 37.05 \mu\text{s}$ a 22-24°C y utilizando 10 mM CaCl₂ en la solución externa. El valor mínimo fue 98 μs y el máximo 243 μs . Como se indicó anteriormente para el proceso de activación, la cinética de cierre de los canales de Ca²⁺ también depende del tipo de ion permeabilizante. Estos datos indican que las células tipo I poseen una población homogénea de canales de Ca²⁺ de deactivación rápida o FD (Armstrong y Matteson, 1985).

4. Inactivación

Durante despolarizaciones de cierta duración se observó una disminución progresiva de la corriente de Ca²⁺ que se debe a la inactivación de los canales que se abrieron al inicio del pulso. En la figura 13 se muestran tres registros de la misma célula obtenidos con pulsos de diferente duración (7, 40 y 220 ms en A, B y C respectivamente). La inactivación sólo es apreciable tras los primeros 10-15 ms de la corriente y, como se ilustra en el trazado C, sigue un curso temporal muy lento ya que la corriente al final del pulso de 220 ms es el 56 % del valor máximo inicial.

Aunque la corriente de Ca²⁺ debida a la actividad de canales FD (o L) se inactiva de forma lenta en todas las preparaciones en las que se ha estudiado, no existe acuerdo sobre si el factor que desencadena el proceso de inactivación es el propio cambio de V_M (como ocurre con los canales de Na⁺ y algunos canales de K⁺) o la entrada de Ca²⁺ al citosol (Fox, 1981; Sánchez y Stefani, 1983; Armstrong y Matteson, 1985; Hagiwara y Byerly, 1981; Tsien, 1983; Carbone y Swandulla, 1989). En el presente trabajo se realizaron experimentos dirigidos a distinguir la posible participación de estos factores (ver Figs. 14 y 15).

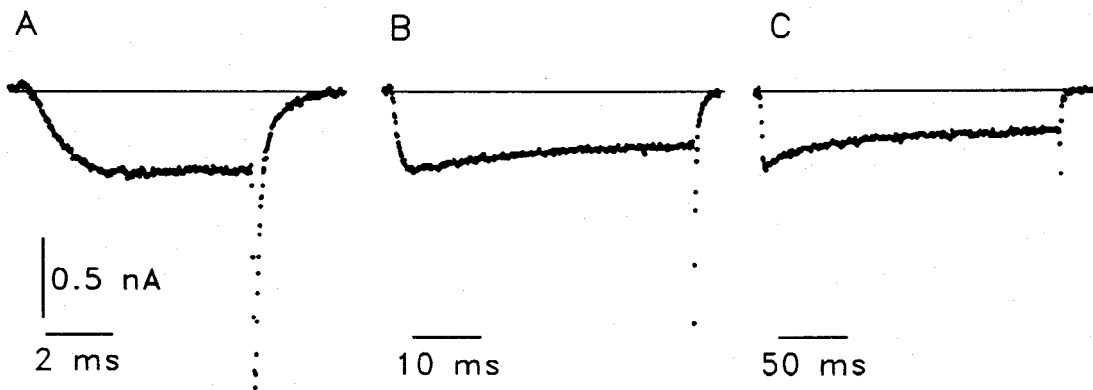


Figura 13. Inactivación de la corriente de Ca^{2+} . A, B y C son tres registros obtenidos con un pulso desde -80 mV a $+10$ mV y duración variable (7, 40 y 220 ms respectivamente). Nótese el curso lento de la inactivación en C. Soluciones $10\text{Ca}/110\text{Cs}, 20\text{F}$. Temperatura, 23 °C.

La inactivación de la corriente de Ca^{2+} en células tipo I parece ser poco dependiente del V_M ya que tras la aplicación de prepulsos de 500-1000 ms de duración a potenciales entre $+20$ y $+40$ mV, en los que casi todos los canales se han activado (Fig. 11A), la inactivación de la corriente nunca es superior al 50% (Fig. 14). Por el contrario, la inactivación parece estar relacionada con el proceso de permeabilización de iones Ca^{2+} . Dos evidencias apoyan la observación anterior: en primer lugar, la práctica ausencia de inactivación cuando se sustituye el Ca^{2+} por Ba^{2+} en el medio extracelular (Fig. 15); en segundo lugar, la mayor inactivación aparece a potenciales en los que la corriente de calcio es máxima (compárense Figs. 9 y 15). Una tercera evidencia en favor de la inactivación inducida por Ca^{2+} es que despolarizaciones a valores cercanos al potencial de equilibrio para calcio, donde la entrada de iones es pequeña, producen escasa inactivación.

RESULTADOS

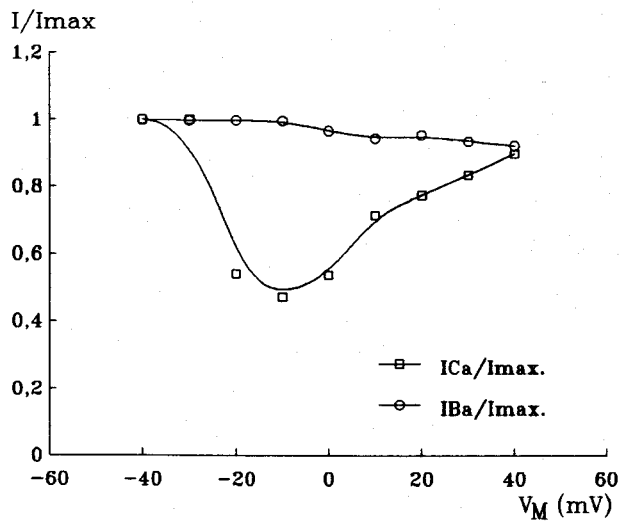
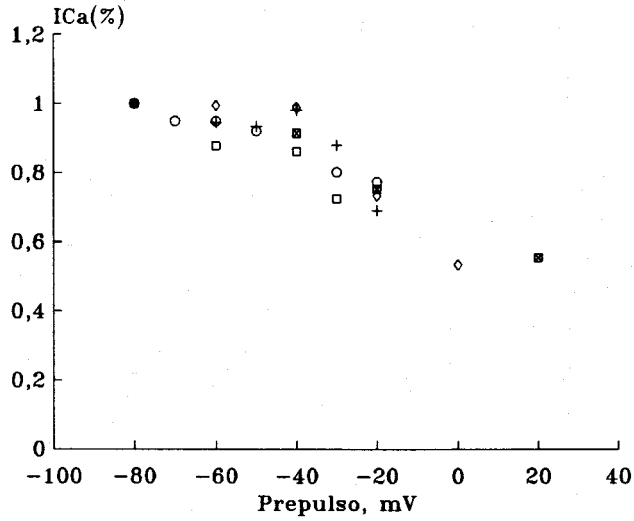


Figura 14. Voltaje-dependencia de la inactivación de la corriente de Ca^{2+} en el estado estacionario. Protocolo de estimulación: se aplicaron prepulsos de 500-1000 ms y de voltaje variable (eje de abcisas), tras los cuales se aplicó un pulso a +20 mV. La amplitud de la corriente se midió en el instante de la repolarización al final del pulso ("tail current").

Figura 15. Calcio-dependencia de la inactivación de la corriente de Ca^{2+} . Los puntos de la gráfica representan la amplitud de la corriente al final del pulso de 15 ms en función de la amplitud máxima durante el pulso. La inactivación que se observa con Ca^{2+} es máxima entre -20 y 0 mV y desaparece al sustituirlo por Ba^{2+} .

5. Modificaciones en las propiedades cinéticas de los canales de Ca^{2+} cuando se usa Ba^{2+} como transportador de carga

Aunque los iones Ba^{2+} no se encuentran en cantidades apreciables en el líquido extracelular, muchos de los estudios realizados sobre las propiedades funcionales y farmacológicas de los canales de Ca^{2+} se han realizado usando Ba^{2+} como transportador de carga, ya que estos iones permeabilizan por los canales de Ca^{2+} mejor que los propios iones Ca^{2+} (ver Hille, 1984). En este apartado se describen las modificaciones en la corriente de Ca^{2+} de las células glómicas cuando este ion se sustituyó por Ba^{2+} extracelular. El estudio comparativo en las dos condiciones experimentales es de importancia para la completa caracterización de los canales de Ca^{2+} en nuestra preparación, ya que se sabe que los iones Ba^{2+} interaccionan específicamente con canales de Ca^{2+} de alto umbral, o tipo L (Fox et al., 1987; Swandulla et al., 1991).

La figura 16A muestra una familia de corrientes de Ca^{2+} obtenida con 10 mM Ca^{2+} en la solución externa (izquierda) y el efecto que produce la sustitución del Ca^{2+} por 10 mM Ba^{2+} en la misma célula (derecha). Como se observa en esta figura, la corriente generada con Ba^{2+} como transportador de carga es mayor (tanto durante el pulso como en la repolarización) que la generada por Ca^{2+} , generalmente en relación 2:1. El aumento en amplitud de la corriente debido a Ba^{2+} se acompaña además de un desplazamiento en la relación corriente-voltaje donde el valor máximo (Fig. 16B, triángulos) se alcanza a un V_M 15-20 mV más negativo que cuando se usa Ca^{2+} externo (Fig. 16B, círculos). Comparando los trazados de la figura 16A se observa que el umbral de activación de la corriente obtenida con Ba^{2+} ocurre a potenciales algo más negativos que los registrados con Ca^{2+} en la solución externa. De igual forma la curva conductancia-voltaje obtenida ajustando a una distribución de Boltzmann los datos de la figura 16A muestran de nuevo una activación más

RESULTADOS

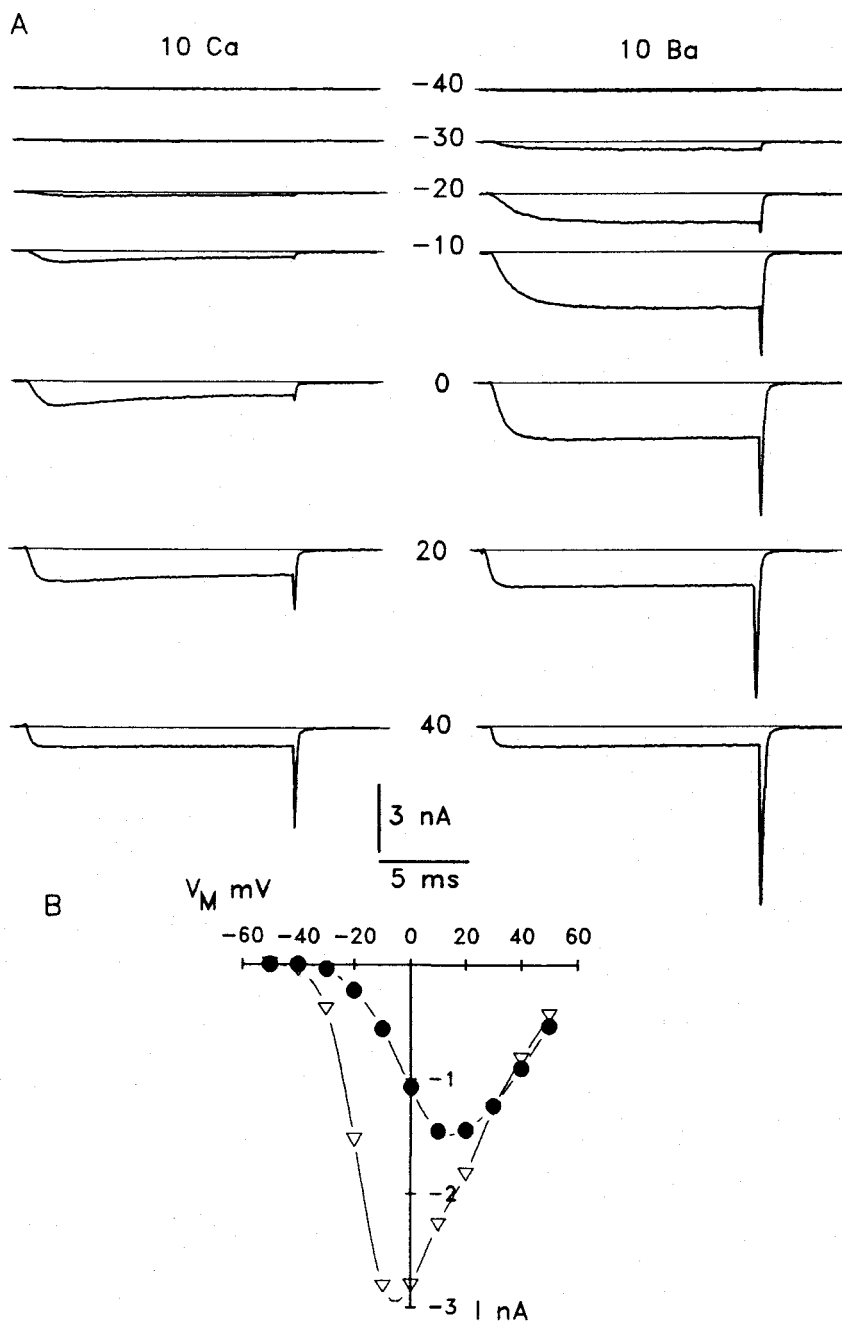


Figura 16. A, familia de corrientes de Ca^{2+} obtenida con 10 mM CaCl_2 en la solución externa (10 Ca) y al sustituirlo por 10 mM BaCl_2 (10 Ba). Pulsos de 15 ms de duración desde -80 mV hasta los valores indicados en cada registro. Soluciones: 10Ca//110Cs, 20F y 10Ba//110Cs, 20F.

B, curvas corriente-voltaje de los registros superiores. 10Ca, círculos oscuros; 10Ba, triángulos.

RESULTADOS

temprana de la corriente debida a Ba^{2+} (ver Fig. 11A, círculos oscuros). En estas condiciones la sensibilidad del canal de Ca^{2+} al voltaje viene dada por la pendiente de la recta P para Ba^{2+} (Fig. 11B, círculos oscuros), que aumenta e-veces cada 6.3 mV. El 50% de la corriente de Ba^{2+} está activada a un potencial de membrana de -7.04 mV, unos 14 mV más negativo que el observado para Ca^{2+} (ver apartado B 2 de "RESULTADOS"). Esta curva G_{Ba} -V se desplazó hacia la izquierda unos 10-15 mV comparada con la de Ca^{2+} (Fig. 11) indicando una desviación hacia potenciales negativos en la dependencia de voltaje de los canales de Ca^{2+} .

La cinética de activación de la corriente no se modificó significativamente cuando se sustituyó Ca^{2+} por Ba^{2+} , mostrándose en todo caso ligeramente más rápida con este último ion (Fig. 17). En la gráfica de la figura 17B se muestra el tiempo medio de activación ($t_{1/2}$) en función del potencial de membrana para Ca^{2+} (círculos) y Ba^{2+} (triángulos), y en ella se observa que la cinética de activación es parecida en las dos condiciones experimentales. En la figura 17A se han superpuesto dos registros escalados de la misma célula obtenidos con Ca^{2+} y Ba^{2+} para mostrar que el curso temporal de la activación de la corriente es similar en ambos casos.

La cinética de deactivación y el curso temporal de la inactivación son los parámetros que se modifican más claramente cuando se sustituye el Ca^{2+} extracelular por Ba^{2+} . Como se comentó anteriormente, el curso temporal de la corriente de cierre representa la cinética de deactivación de los canales de Ca^{2+} , y en las células glómicas se ajusta a una exponencial simple. En presencia de 10 mM Ba^{2+} , la "tail current" se ajustó también a una función exponencial con una única constante de tiempo τ , pero a diferencia de lo observado con Ca^{2+} , la τ es más lenta con 10 mM Ba^{2+} . El valor medio de τ en 18 células fue $221.05 \pm 68.17 \mu s$ con 10 mM Ba^{2+} en el medio externo, mientras que con 10 mM Ca^{2+} , como se indicó en el apartado B 3, fue $162.6 \pm 37.05 \mu s$.

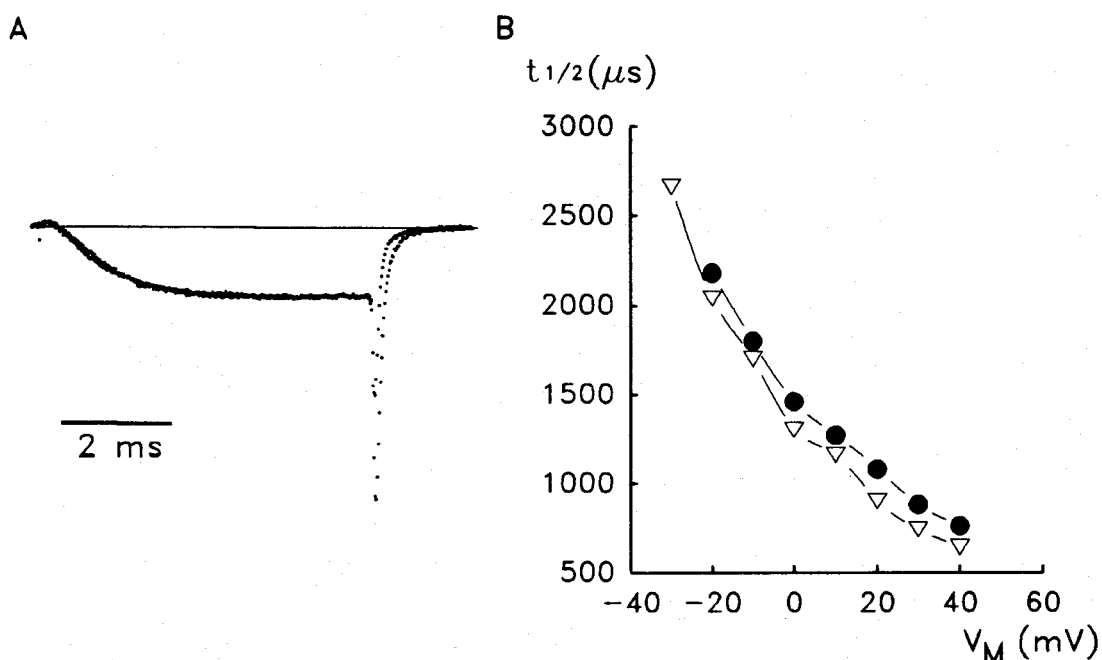


Figura 17. A, registros superpuestos y escalados obtenidos con 10 mM Ca^{2+} y 10 mM Ba^{2+} en la misma célula. Pulso de 7 ms a +10 mV. Nótese que la fase de activación de la corriente es similar en ambos casos. Soluciones 10Ca-10Ba//110Cs20F. B, tiempo medio de activación ($t_{1/2}$) de la corriente de Ca^{2+} (círculos oscuros) y Ba^{2+} (triángulos) en función del potencial de membrana. Datos de la misma célula. Compárese con la Fig. 10.

En la figura 18 se muestra un ejemplo del efecto del Ba^{2+} sobre la "tail current" de una célula glómica. En A se ha ajustado la corriente de cierre obtenida con 10 mM Ca^{2+} a una función exponencial (línea continua) con una constante de tiempo $\tau = 153 \mu s$. La sustitución de este ion por 10 mM Ba^{2+} aumentó el valor de τ a 272 μs (Fig. 18B, derecha). Ambos trazados, A y B, se obtuvieron con un mismo pulso de potencial desde -80 a +20 mV. Puesto que estos resultados podrían deberse a un artefacto causado por un cambio de la resistencia en serie debido a la diferencia en amplitud de la corriente de cierre, se realizó el mismo análisis usando registros con Ca^{2+} y Ba^{2+} de una misma célula donde la amplitud

RESULTADOS

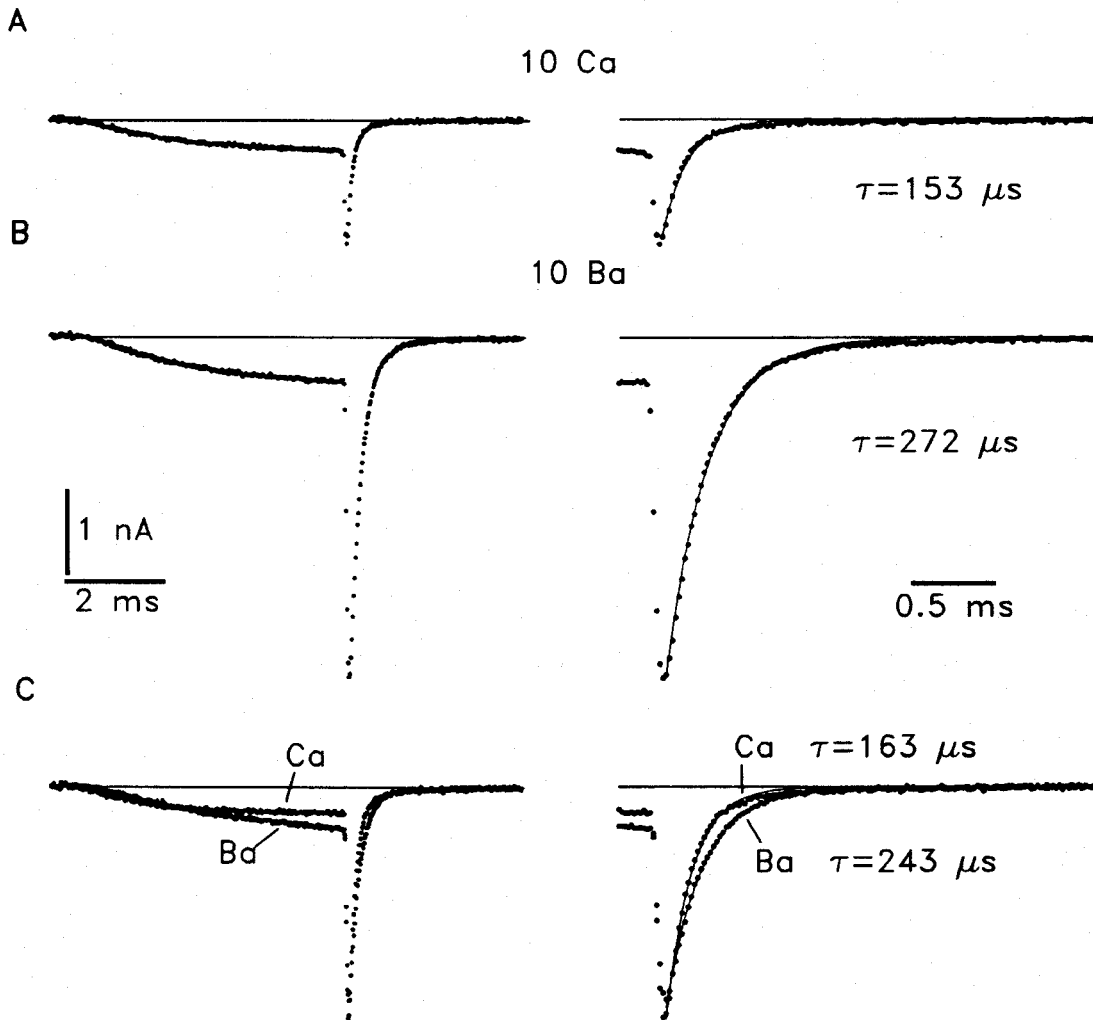


Figura 18. Efecto del bario sobre la cinética de cierre. A, registro obtenido con un pulso de 6 ms a 0 mV con 10 mM Ca^{2+} en la solución externa (izquierda) y aislamiento de la corriente de cierre (derecha), que se ajusta a una función exponencial (línea continua). Las constantes de tiempo (τ) se muestran junto a cada trazado. B, registro con 10 mM Ba^{2+} en la misma célula del panel A (izquierda), pulso de 6 ms a 0 mV. Derecha, ajuste exponencial de la corriente de cierre. Nótese el enlentecimiento de la misma comparada con la obtenida con 10 mM Ca^{2+} . C, registros superpuestos obtenidos con 10 mM Ca^{2+} (pulso a +40 mV, 6 ms) y con 10 mM Ba^{2+} (pulso a +10 mV, 6 ms) en la misma célula (izquierda). Derecha, ajuste exponencial de la corriente de cierre. Soluciones, 10Ca//110Cs, 20F, 10Ba//110Cs, 20F. Temperatura, 21 °C.

RESULTADOS

de la corriente de cierre fuera parecida (Fig. 18C), resultando que la cinética de cierre sigue siendo más lenta en presencia de Ba^{2+} (los valores de τ en cada caso se muestran sobre sus trazados respectivos). Estas observaciones muestran que el cierre de los canales de Ca^{2+} es más lento cuando el ion que permeabiliza por ellos es Ba^{2+} en vez de Ca^{2+} , aunque su curso temporal sigue ajustándose a una exponencial sencilla.

La inactivación de la corriente de Ca^{2+} que se observa en pulsos de larga duración cuando el transportador de carga es Ca^{2+} (ver apartado B 4 "RESULTADOS") desaparece al sustituir este ion por Ba^{2+} (ver Figs. 16 y 19), lo que indica que el paso de Ca^{2+} por el canal puede estar implicado en el proceso de inactivación. Esta dependencia de Ca^{2+} de la inactivación podría deberse al paso del estado de canal activado a un estado de bloqueo de forma proporcional al número de iones de calcio que atraviesan el canal (Mazzanti et al., 1991). Este modelo asume que el Ca^{2+} al pasar por el canal es capaz de bloquear poros adyacentes, lo que explicaría la rapidez de la cinética de inactivación de canales tipo L cuando su densidad es muy elevada.

En la figura 19 se muestran superpuestos dos barridos de la misma célula que resumen las modificaciones inducidas por Ba^{2+} sobre la corriente de Ca^{2+} . El trazado se obtuvo inicialmente con 10 mM Ca^{2+} y posteriormente se sustituyó por 10 mM Ba^{2+} . En ambos casos la corriente se generó por la aplicación de un pulso de voltaje desde -80 a 0 mV de 15 ms de duración. En estos trazados se observa un aumento en la amplitud de la corriente registrada con Ba^{2+} durante el pulso y en el tamaño de la corriente de cierre ("tail current"). También es evidente la práctica desaparición de la inactivación y el enlentecimiento de este proceso en presencia de Ba^{2+} .

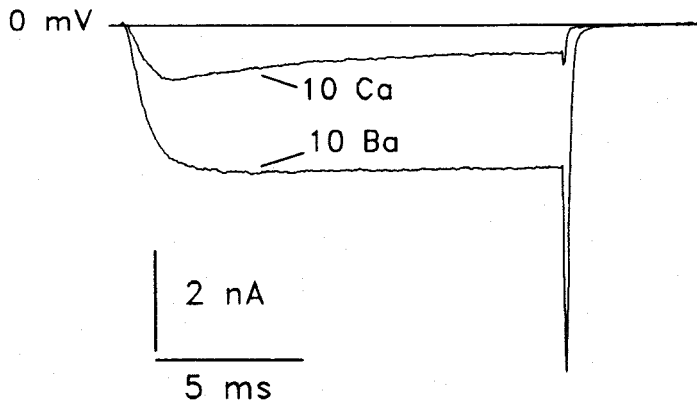


Figura 19. Modificaciones de la corriente de Ca^{2+} cuando se utiliza Ba^{2+} como transportador de carga. Se han superpuesto dos registros de la misma célula, obtenidos inicialmente con 10 mM Ca^{2+} en la solución externa (10 Ca en la figura), sustituyendo posteriormente el calcio por 10 mM Ba^{2+} . Pulso de 15 ms a 0 mV. HP=-80 mV. Soluciones, 10Ca//110Cs, 20F, 10Ba//110Cs, 20F. Temperatura, 30 °C.

6. Resumen de las características electrofisiológicas de la corriente de calcio de células glómicas.

En función de los resultados presentados a lo largo de este apartado la corriente de calcio de las células glómicas se puede clasificar como debida a la activación de una población homogénea de canales dependientes de voltaje tipo L, de alto umbral, o FD (*fast-deactivating*) (Llinás y Yarom, 1981; Carbone y Lux, 1984; Matteson y Armstrong, 1984; Cota, 1986; Tsien y col., 1988; Castellano y López-Barneo, 1991).

Las características electrofisiológicas de la corriente de calcio de las células glómicas son:

RESULTADOS

Conductancia relativa	Ba ²⁺ > Ca ²⁺
Rango de activación	Alto (de -40 a +10 mV)
Rango de inactivación	Muy lento ($\tau > 500$ ms)
Cinética de deactivación	Rápida ($\tau = 165 \mu\text{s}$, 10 Ca; $221 \mu\text{s}$, 10 Ba)
Sensibilidad al voltaje de G _{Ca}	P = 7.45 mV por cambio e veces en V _M
Sensibilidad al voltaje de G _{Ba}	P = 6.30 mV por cambio e veces en V _M
V _M al que se alcanza el 50% de G _{Ca}	5.80 mV
V _M al que se alcanza el 50% de G _{Ba}	-7.04 mV
Bloqueantes inorgánicos (*)	Cd ²⁺ > Co ²⁺ \approx Ni ²⁺
Bloqueantes orgánicos(*)	Sensible a dihidropiridinas

(*) *Estas propiedades farmacológicas se tratan en el siguiente apartado ("los cationes divalentes y las dihidropiridinas modifican la corriente de Ca²⁺").*

Los parámetros cinéticos se obtuvieron con soluciones 10 mM Ca²⁺ o 10 mM Ba²⁺//110Cs, 20F, 10 mM EGTA y 3 mM ATP. Temperatura 22-24°C. P indica la pendiente de la recta de la relación conductancia-voltaje (véase explicación en el apartado B 2 "Cinética de activación").

C) LOS CATIONES DIVALENTES Y LAS DIHIDROPIRIDINAS MODIFICAN LA CORRIENTE DE Ca^{2+}

Los canales iónicos interactúan específicamente con los iones que los atraviesan y con ciertas moléculas que, uniéndose a sitios específicos del canal, modifican sus propiedades biofísicas. Un ejemplo, ya tratado en el apartado anterior, es el efecto que ejercen los iones Ba^{2+} sobre la corriente de Ca^{2+} . En el presente trabajo se realizó una caracterización farmacológica general de la corriente de Ca^{2+} de células glómicas que permitiese hacer un estudio comparativo con otras corrientes de calcio de alto umbral. Se presenta en primer lugar el efecto bloqueante de algunos cationes divalentes y posteriormente las modificaciones inducidas por las dihidropiridinas.

1. Bloqueantes inorgánicos. Efecto de metales de transición sobre la corriente de Ca^{2+}

Se conoce desde hace tiempo que algunos cationes divalentes, como los metales de transición (Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+}), Mn^{2+} , Mg^{2+} y algunos cationes trivalentes como La^{3+} actúan como bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (Hagiwara y Takahashi, 1967; Kohlhardt et al., 1972; Lansman et al., 1986), ya que interactúan con los sitios de unión para Ca^{2+} en el canal. La distinción entre ion permeabilizante e ion bloqueante es en ocasiones difícil de establecer pues ambos procesos probablemente se diferencian sólo en la afinidad de cada catión por sitios de unión cargados negativamente, localizados en el poro de conducción (Tsien, 1983). La potencia de bloqueo no es la misma para todos los cationes y en función de ella se pueden clasificar por su efectividad (Hagiwara y Takahashi, 1967). Asimismo se ha descrito que la potencia de bloqueo de cada catión varía según el tipo de canal de Ca^{2+} sobre el que actúan (Fox et al., 1987; Carbone et al., 1988).

RESULTADOS

En este trabajo se estudió el efecto de Cd^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} sobre la corriente de Ca^{2+} . Los tres cationes aplicados extracelularmente disminuyeron la amplitud de la corriente, aunque con diferentes resultados en cuanto a potencia y reversibilidad del efecto. La figura 20 muestra la desaparición total de la corriente de Ca^{2+} obtenida durante un pulso a +10 mV al aplicar en el medio extracelular 5 mM CdCl_2 . El bloqueo, aunque completo, es reversible. Como se observa en el trazado de la derecha, la corriente se recuperó casi en su totalidad al retirar el bloqueante ("Lavado" en la figura).

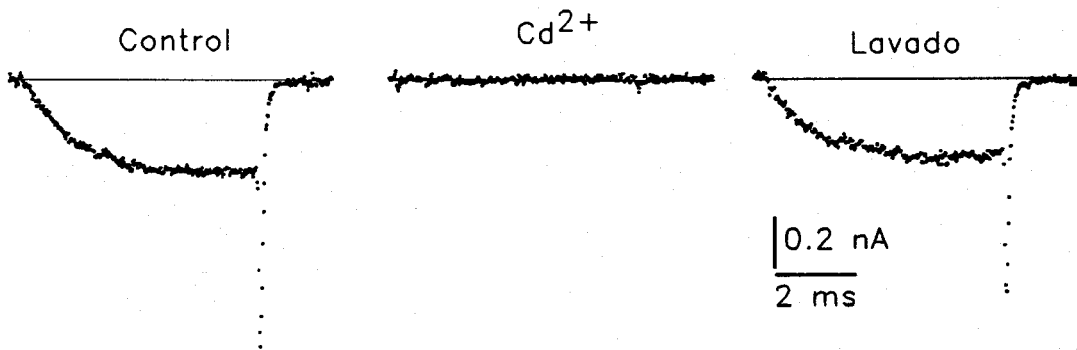


Figura 20. Bloqueo de la corriente de Ca^{2+} por Cd^{2+} . La corriente inicial (control) desaparece al añadir 5 mM CdCl_2 (trazado central), recuperándose al retirar el bloqueante (Lavado). Pulsos de 6 ms a +10 mV. HP=-80 mV. Soluciones 10Ba//130Cs.

A igualdad de concentración (1 mM) el mayor efecto inhibitorio se obtuvo con Cd^{2+} , frente a un bloqueo sensiblemente menor de Ni^{2+} y Co^{2+} . En la parte inferior de la figura 21A se presenta un registro de corriente con un componente inicial de Na^+ seguido de un componente de Ca^{2+} (trazado "Control" en la figura). Al aplicar 1 mM CdCl_2 se inhibió totalmente la corriente de Ca^{2+} durante el pulso sin apenas modificarse el componente inicial de Na^+ . Este mismo efecto se puede

RESULTADOS

observar en todo el rango de potencial desde -30 mV hasta 50 mV, como se muestra en la curva I-V de la figura 21A (parte superior), donde la corriente control (círculos) desaparece al añadir Cd^{2+} en el medio extracelular (triángulos oscuros). El bloqueo de I_{Ca} fue reversible en parte (triángulos claros), recuperándose el 60-75% de la amplitud de la corriente inicial. Aunque el Cd^{2+} inhibió completamente la corriente durante el pulso, la "tail current" se redujo sólo parcialmente a pesar de haberse empleado una concentración bastante alta del catión. Este hecho puede deberse a que el efecto bloqueante del Cd^{2+} es dependiente de voltaje (Chow y Armstrong, 1988) y en el momento de la repolarización se favorece la salida de Cd^{2+} del canal y por lo tanto el desbloqueo de la corriente.

Un efecto parecido al Cd^{2+} tiene el Ni^{2+} , que cuando se añade al medio externo produce una inhibición reversible de la corriente de Ca^{2+} , aunque menos potente que la observada con Cd^{2+} . Al igual que ocurre con Cd^{2+} el componente de Na^+ tampoco se vió afectado por Ni^{2+} . La eficacia bloqueante de Cd^{2+} frente a Ni^{2+} se ilustra en la figura 21B, donde en la parte superior se muestra la curva I-V control (círculos) obtenida con 10 mM CaCl_2 , y la curva resultante al añadir al medio externo 1 mM NiCl_2 (triángulos claros). Tras la recuperación de la corriente se añadió la misma concentración de CdCl_2 (triángulos oscuros), desapareciendo la I_{Ca} casi totalmente. En este experimento Ni^{2+} redujo la corriente un 44% durante un pulso de 7 ms a +20 mV, mientras que Cd^{2+} lo hizo en un 96% (Fig. 21B, parte inferior). Al igual que ocurrió con Cd^{2+} , al retirar el Ni^{2+} de la solución externa la corriente de Ca^{2+} se recuperó parcialmente (76 %).

Con un protocolo similar al utilizado para los cationes anteriores, el Co^{2+} mostró un efecto de bloqueo parcial de I_{Ca} (Fig. 21C, parte inferior), que se redujo

RESULTADOS

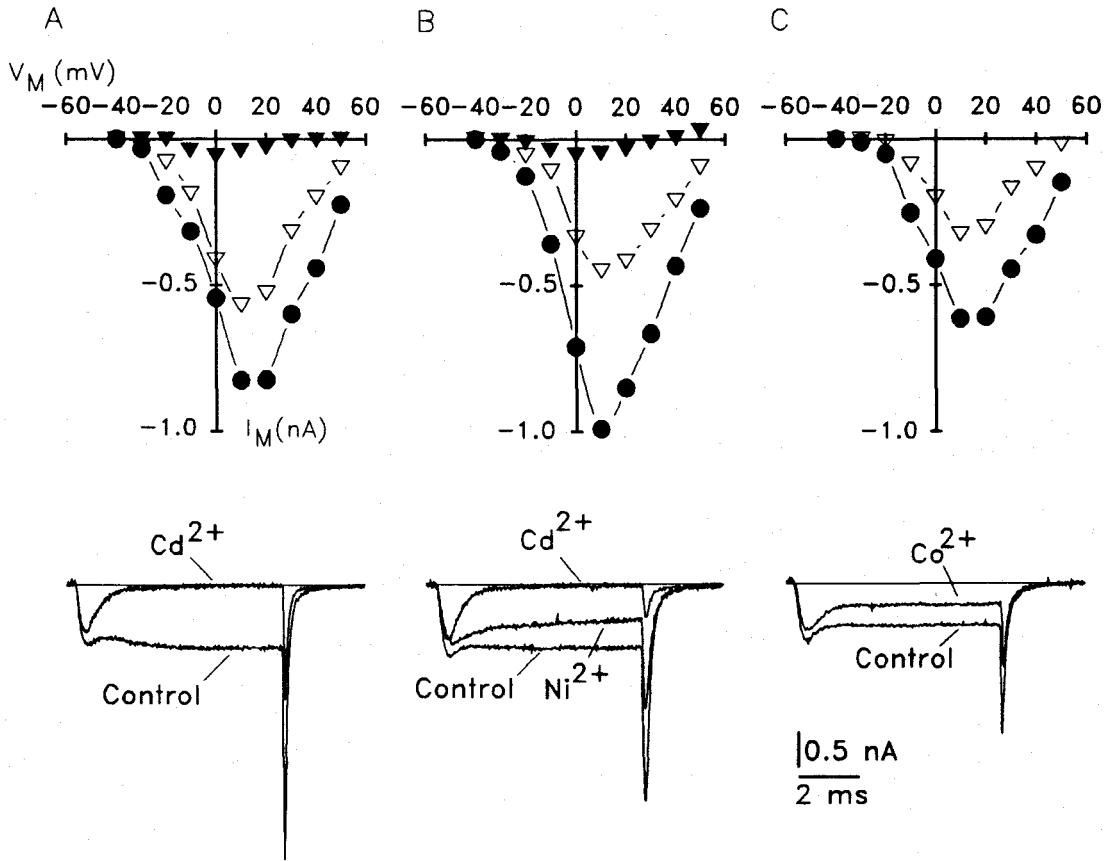


Figura 21. Bloqueantes inorgánicos de la corriente de Ca^{2+} . A, parte inferior, pulso control y en presencia de 1 mM CdCl_2 ; parte superior, curva corriente-voltaje control (círculos oscuros), con Cd^{2+} (triángulos oscuros) y recuperación al retirar el bloqueante (triángulos claros). B, parte inferior, registro control, y resultado de añadir 1 mM NiCl_2 y tras la recuperación, 1 mM CdCl_2 . En la parte superior se muestra la curva $I-V$ control (círculos oscuros), en presencia de 1 mM Ni^{2+} (triángulos claros) y 1 mM Cd^{2+} (triángulos oscuros). C, registro control y en presencia de CoCl_2 (inferior) y relación $I-V$ (superior). Círculos oscuros, control; triángulos, efecto de 1 mM Co^{2+} . Todos los trazados de la figura se obtuvieron con pulsos a $+20 \text{ mV}$ y de 7 ms de duración. Soluciones $10\text{Ca}/130\text{Cs}$. $\text{HP} = -80 \text{ mV}$.

RESULTADOS

en este caso un 43 %. El componente inicial de Na^+ no se afectó por Co^{2+} , al igual que ocurrió con Cd^{2+} y Ni^{2+} . En la parte superior de la figura 21C se muestra la disminución de la curva I-V al añadir al medio externo 1 mM CoCl_2 . Sin embargo, a diferencia de los metales anteriores, en este experimento el efecto bloqueante de Co^{2+} fue irreversible ya que no se consiguió recuperar la corriente inicial de Ca^{2+} al retirarlo de la solución externa.

En conclusión, el Cd^{2+} aplicado extracelularmente es el catión con un efecto bloqueante más potente, aunque muy reversible. El Ni^{2+} es menos efectivo, pero como Cd^{2+} , es también reversible. Sin embargo, Co^{2+} a la misma concentración que los cationes anteriores, aunque tiene un efecto inhibidor similar al de Ni^{2+} , parece actuar de forma irreversible. En función de su potencia, la secuencia de bloqueo de I_{Ca} por los cationes divalentes es $\text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \approx \text{Co}^{2+}$. Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores en canales de Ca^{2+} tipo L de diferentes preparaciones (Hille, 1984; Lansman et al., 1986; Fox et al., 1987; Chow y Armstrong, 1988; Tsien et al, 1988; Carbone et al., 1988).

2. Bloqueantes orgánicos. Efectos de Nifedipina y Elgodipina.

En una gran variedad de células excitables la entrada de iones de Ca^{2+} al citosol puede inhibirse por diferentes compuestos orgánicos como verapamil, D600, diltiazem y algunas dihidropiridinas como nifedipina, nitrendipina y niguldipina (Fleckenstein, 1977; Lee y Tsien, 1983; Hess et al., 1984; Klöckner e Isenberg, 1989). Estas fármacos se conocen con el nombre genérico de "calcioantagonistas" (Fleckenstein, 1977). Dentro de este grupo, las 1-4 dihidropiridinas (DHP) tienen una gran importancia por su uso clínico en el tratamiento de arritmias cardíacas, angor pectoris e hipertensión (Schwartz y Taira, 1983; Triggle, 1987) y por emplearse como ligandos específicos para la purificación y reconstitución de canales de Ca^{2+} (Janis et al., 1987).

RESULTADOS

Con objeto de realizar un análisis general del efecto de las DHP sobre los canales de Ca^{2+} en células tipo I se empleó en nuestro estudio la nifedipina y la elgodipina. La primera es quizás la DHP más conocida y utilizada, tanto en clínica como en la caracterización farmacológica de canales de Ca^{2+} (Hess et al., 1984; Fox et al., 1987), y la segunda es un nuevo fármaco derivado de la oxodipina que posee unas características peculiares, pues a diferencia del resto de las DHP carece de fotosensibilidad y es ligeramente hidrosoluble (ver "MATERIAL Y METODOS").

La nifedipina aplicada al medio extracelular a concentración μM inhibe la corriente de Ca^{2+} (Fig. 22). El efecto se consigue a las pocos segundos de la aplicación y es más acusado cuanto más despolarizada está la célula. Como se ilustra en la figura 22, a un potencial de membrana de +20 mV la nifedipina a una concentración de 50 μM inhibió el 66% de la I_{Ca} (A en la figura), mientras que a +40 mV el efecto fue un 87.5% (B). De igual forma se alcanza un mayor bloqueo si previamente se ha estimulado la célula con un tren de pulsos despolarizantes. Este fenómeno aparece también con otros bloqueantes orgánicos como verapamil y D600 (Lee y Tsien, 1983) y es similar al observado con anestésicos locales que bloquean I_{Na} , cuya acción es *dependiente de uso*, indicando la necesidad de que el canal esté activado para que el fármaco pueda unirse al receptor y ejercer su efecto (Hille, 1966, 1977, y 1984; Lee y Tsien, 1983).

En la figura 22C y D se han superpuesto los trazados escalados de la fase de activación y cierre de la corriente de Ca^{2+} obtenidos en las condiciones control, durante la aplicación de nifedipina y tras la recuperación de la corriente al retirar el fármaco. La nifedipina no modificó la cinética de deactivación de I_{Ca} , ya que la "tail current" es similar en la situación control y durante el efecto (Fig. 22D).

RESULTADOS

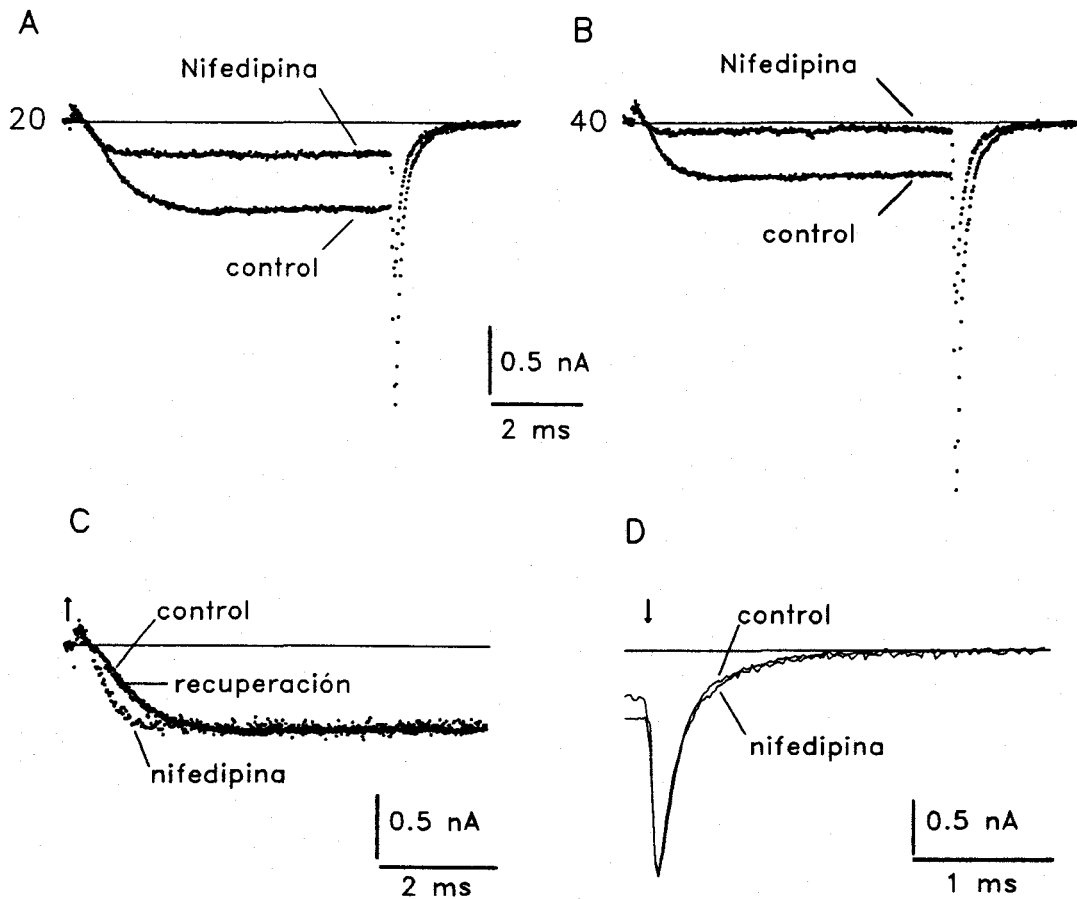


Figura 22. Inhibición de la corriente de Ca^{2+} por nifedipina ($50 \mu\text{M}$). A, registros superpuestos control y al añadir nifedipina obtenidos con pulsos de 7 ms a +20 mV. B, iguales condiciones que en A, excepto el pulso (+40 mV en este caso). C, Fase de activación de la corriente de Ca^{2+} en situación control, durante la aplicación de nifedipina $50 \mu\text{M}$ y tras la recuperación. La flecha indica el comienzo del pulso. Nótese que la activación es más rápida en presencia de nifedipina. C, corriente de cierre obtenida al repolarizar desde +20 mV a -80 mV con solución control y con nifedipina. La flecha indica el final del pulso. Soluciones, 10Ca//130Cs.

Sin embargo, la cinética de activación de la corriente resultó más rápida en presencia de nifedipina, volviendo de nuevo a su valor inicial cuando se retiró el bloqueante (Fig. 22C). El curso temporal de la activación (cuantificado como $t_{1/2}$)

RESULTADOS

fue 1.12 ms con la solución control, 0.72 ms con nifedipina 50 μM y 1.02 ms en la recuperación al aplicar un pulso a +20 mV de 7 ms de duración. No se observó ninguna modificación en el curso temporal de la inactivación de la corriente durante la aplicación de nifedipina (véanse los trazados de las Figs. 22A y B).

La elgodipina produjo una disminución de la I_{Ca} similar a la de nifedipina, pero a concentraciones inferiores en tres órdenes de magnitud (en el rango nM, Fig. 23A y B), lo que indica una potencia de bloqueo muy superior a la de otras dihidropiridinas. El efecto de la elgodipina es rápido, se observa a los pocos segundos de aplicar el fármaco y, a diferencia de la nifedipina, no parece ser voltaje-dependiente. Con pulsos de potencial de -10, +10 y +30 mV la elgodipina (10^{-9} M) redujo la I_{Ca} un 62.5, 66.6 y 65.7% respectivamente, por lo cual su acción -al contrario que la nifedipina- no parece ser dependiente de potencial. En la figura 23C se presenta también de forma gráfica la disminución de la I_{Ca} (ordenadas) frente al tiempo (abcisas) al añadir elgodipina en cortos periodos (líneas horizontales). Para demostrar que todo el componente registrado es debido a I_{Ca} se abolió la corriente con Cd^{2+} , la cual se recuperó posteriormente al retirar el catión.

A diferencia de la nifedipina, la elgodipina no modificó los parámetros cinéticos de la corriente de Ca^{2+} (Figs. 23D y E; compárense con las Figs. 22C y D). El curso temporal de la inactivación no varió al aplicar elgodipina, como se observa en los trazados de la figura 23B, obtenidos con un pulso de 220 ms de duración en condiciones control y con 10^{-9} M elgodipina. Los trazados de la figura 23D y E muestran el ajuste escalado de la fase de activación y deactivación de los registros control y en presencia de elgodipina. En ellos se observa que el curso temporal de la activación y de la cinética de cierre son similares en los dos casos. Por tanto, el efecto inhibitor del fármaco se debe probablemente a una reducción del número de canales que permiten la entrada de Ca^{2+} al citosol, sin que se modifiquen sus características cinéticas.

RESULTADOS

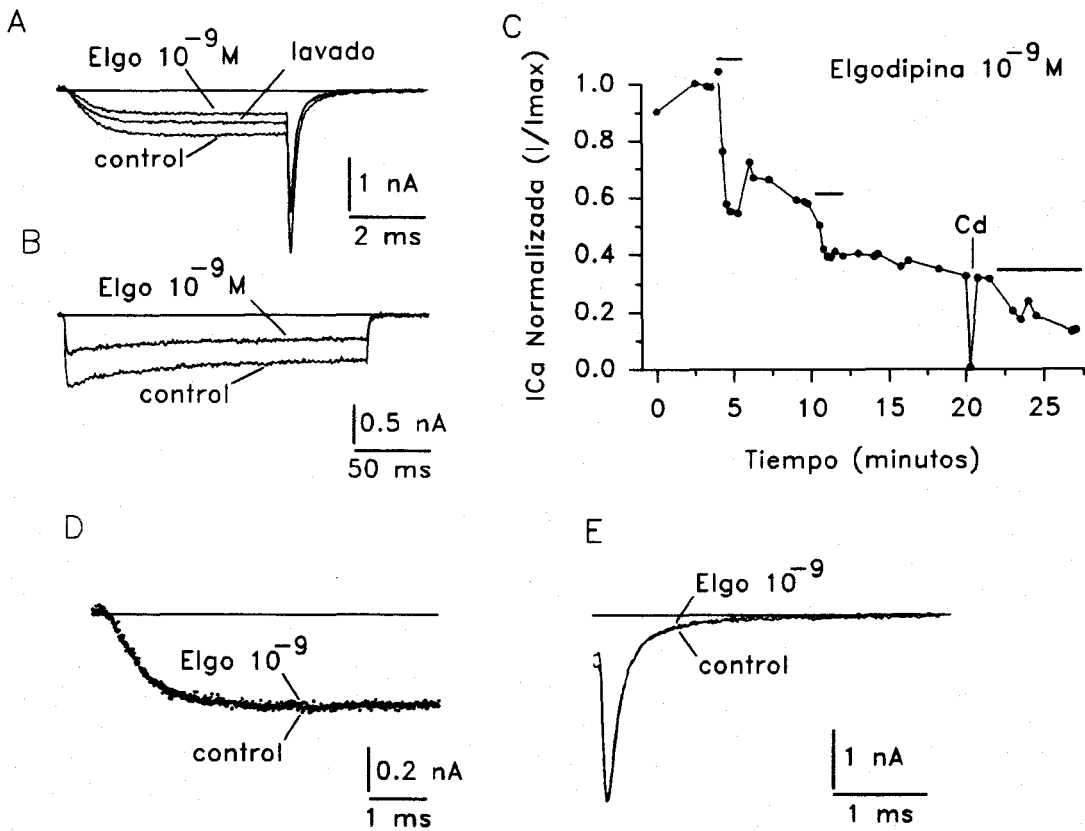


Figura 23. Disminución de la corriente de Ca^{2+} por elgodipina 10^{-9} M. A, pulsos de 6 ms a +10 mV en situación control, en presencia de elgodipina y tras la recuperación. B, trazados control y efecto de elgodipina; pulso de 220 ms a +10 mV. C, curso temporal completo del efecto de elgodipina. Los trazos continuos indican el tiempo durante el que se aplicó el fármaco. A los 20 minutos de registro se añadió Cd^{2+} a la solución externa para demostrar que el componente registrado se debe a la actividad de canales de calcio. D y E, fases de activación y cierre de la corriente de Ca^{2+} en situación control y en presencia de elgodipina 10^{-9} M. Soluciones, 10Ba//130Cs.

El efecto de elgodipina fue poco o nada reversible cuando se aplicó a concentraciones superiores (entre 10^{-7} - 10^{-5} M). Como se observa en la figura 24A, la primera exposición a elgodipina 10^{-7} M redujo la corriente inicial un 60%, sin

RESULTADOS

conseguir recuperarse una vez se retiró el fármaco. En la segunda aplicación el efecto fue parecido, con escasa reversibilidad. Aunque la acción bloqueante de la elgodipina parece bien establecida, ésta mostró un efecto paradójico a dosis inferiores a 10^{-9} M, comportándose como agonista de la corriente de Ca^{2+} . Este efecto se presenta en concentraciones del orden 10^{-11} M (Fig. 24B) aumentando reversiblemente la I_{Ca} casi un 20% respecto al control. La aplicación repetida del fármaco vuelve a producir el mismo resultado, como se ilustra en la gráfica de la figura 24B. Este efecto dual, o comportamiento como agonista parcial ocurre también en determinados bloqueantes orgánicos como diltiazem (100 nM) y D600 (Katzka y Morad, 1989) y algunas DHP como nifedipina (Boll y Lux, 1985), nitrendipina a concentración submicromolar (Hess et al, 1984) o niguldipina (bloqueo a dosis $> 10^{-7}$, agonista en el rango 50-200 nM: Klöckner y Isemberg, 1989), mientras que otras sólo muestran actividad agonista, como Bay K 8644 (10^{-6} - 10^{-7} M) o CGP 28 392 (Schramm et al., 1983; Hess et al., 1984).

Dado que algunas DHP pueden disminuir también la corriente de Na^{+} y K^{+} y alterar su dependencia del voltaje (Hagiwara y Byerly, 1981) se estudió la acción tanto de nifedipina como de elgodipina sobre estas conductancias iónicas. Nuestros datos muestran que el efecto de los dos bloqueantes fue selectivo para I_{Ca} y no modificaron la corriente de Na^{+} ni la de K^{+} .

En conclusión, la corriente de Ca^{2+} de las células tipo I se puede modificar por diferentes moléculas, tanto orgánicas como inorgánicas. Entre estas últimas, los metales de transición Cd^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} ejercen como bloqueantes de la corriente de Ca^{2+} , siendo Cd^{2+} el más potente. El efecto bloqueante tanto de Ni^{2+} como de Cd^{2+} fue reversible, mientras que tras la aplicación de Co^{2+} no se consiguió recuperar la I_{Ca} . Las dihidropiridinas aplicadas extracelularmente inhiben la corriente de Ca^{2+} a concentraciones en el rango micromolar sin alterar la I_{Na} ni la I_{K} .

RESULTADOS

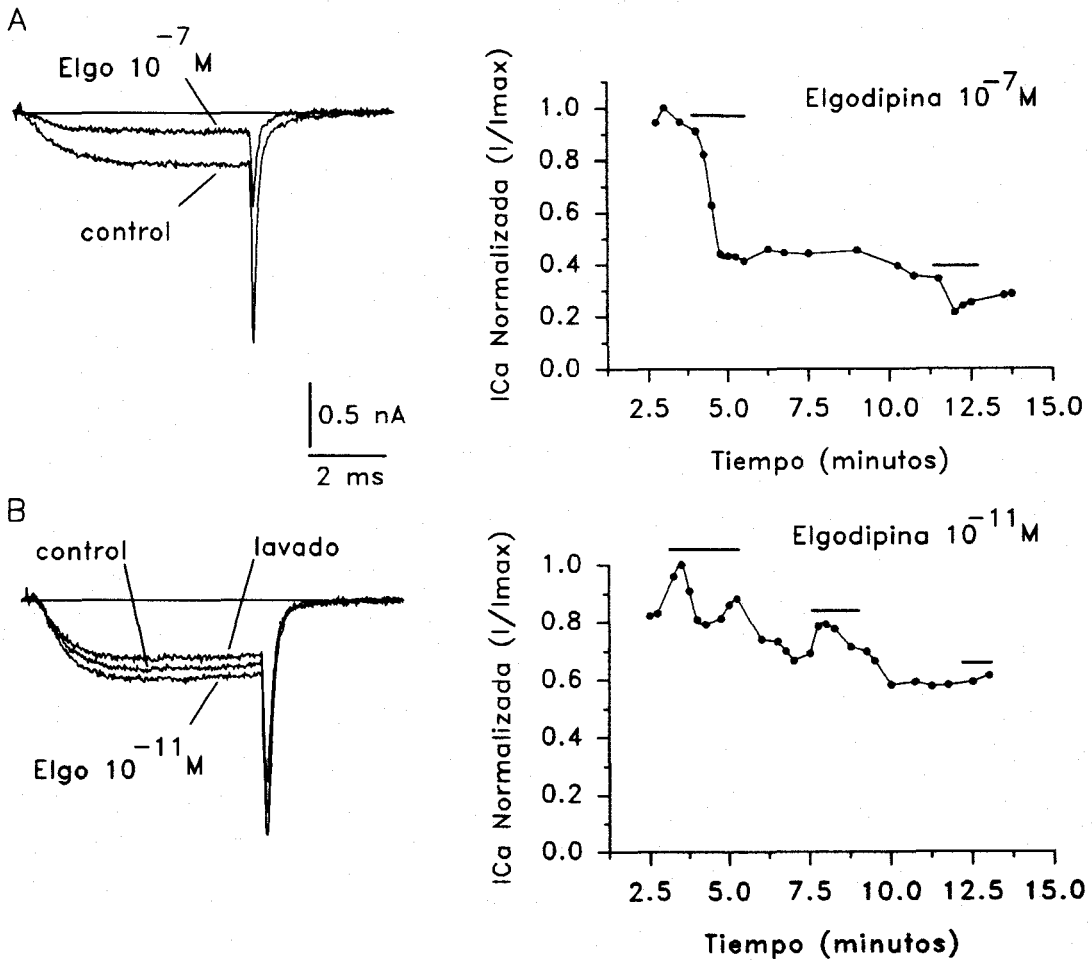


Figura 24. Efecto de elgodipina a diferentes concentraciones. A, elgodipina 10^{-7} M disminuye la corriente de Ca^{2+} (izquierda). Derecha, curso temporal completo del efecto, que no es recuperable. B, acción agonista de elgodipina 10^{-11} M sobre la corriente de Ca^{2+} . A la izquierda se presentan los trazados control, efecto y tras la recuperación. A la derecha, aumento de la corriente en tres aplicaciones repetidas del fármaco. Pulsos de 6 ms a +10 mV. Soluciones 10Ba//130Cs.

El bloqueo de la I_{Ca} por nifedipina es dependiente de voltaje, lo que no parece ocurrir con elgodipina. Esta última DHP resultó ser un eficaz bloqueante a concentraciones nM y mostró además un efecto agonista de la corriente de Ca^{2+}

RESULTADOS

cuando se aplicó a dosis subnanomolares, de forma parecida al descrito para otras dihidropiridinas.

D) LA CORRIENTE DE Ca^{2+} ESTA SUJETA A REGULACION METABOLICA

El registro de corrientes iónicas en el modo "whole-cell" implica la diálisis del citosol con la solución contenida en la micropipeta de registro (véase "MATERIAL Y METODOS"). En estas condiciones es bien conocido que cuando se equilibra el contenido intracelular con la solución salina de la micropipeta la corriente de Ca^{2+} no es estable, sino que disminuye progresivamente. Este fenómeno se conoce como lavado de la corriente, "wash-out" o "run-down" y se ha descrito en varios tipos de células incluyendo neuronas, tejido muscular cardíaco, hipófisis y células cromafines (Fedulova et al., 1981; Byerly y Hagiwara, 1982; Fenwick et al., 1982; Armstrong y Matteson, 1985; Cota, 1986; Castellano y López-Barneo, 1991). En las mismas condiciones experimentales las corrientes de Na^+ y K^+ apenas se modifican (Hagiwara y Byerly, 1983; véase no obstante Fernández et al., 1983). Este fenómeno parece ser característico de canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación (tipo L o FD) puesto que no se observa en canales de calcio de bajo umbral, o tipo T (Nowycky et al, 1985; Cota, 1986; Tabares et al., 1989; Castellano y López-Barneo, 1991). La hipótesis aceptada actualmente postula que la desaparición de la corriente de Ca^{2+} se debe a la depleción de metabolitos intracelulares que son necesarios para el mantenimiento funcional de los canales de Ca^{2+} (Hagiwara y Byerly, 1983).

En este apartado se describe el lavado de la corriente de Ca^{2+} de las células tipo I y se estudian los posibles mecanismos moleculares responsables de este fenómeno. Los experimentos se diseñaron además para establecer las condiciones

idóneas de registro de la corriente de Ca^{2+} durante un periodo prolongado y para analizar su posible regulación metabólica.

1. El fenómeno del lavado de la corriente de calcio

Al igual que ocurre en otras células, la corriente de Ca^{2+} de las células glómicas disminuye conforme se dializa el medio intracelular y la solución de registro difunde al citosol. La disminución de la actividad de los canales de Ca^{2+} se presenta sin que se observen signos de deterioro celular ni cambios aparentes en la resistencia en serie o del sello. El proceso de lavado y su curso temporal se ilustran en la figura 25 mediante registros de I_{Ca} en una célula donde la solución interna contenía Cs^+ y Ca^{2+} (este último catión en el rango nM). A la izquierda de la figura se muestran tres trazados de I_{Ca} obtenidos a los 0.5, 2 y 4.5 min tras el establecimiento de la configuración "whole-cell". El lavado de la corriente fue muy rápido en estas condiciones y la corriente inicial disminuyó un 85% en los primeros 4.5 minutos de registro. El curso temporal completo del proceso de lavado de I_{Ca} se ilustra en la parte derecha de la figura. Los círculos representan la amplitud normalizada de la corriente medida en el instante de la repolarización ("tail current") en función del tiempo de diálisis. Tras el lavado rápido en los primeros minutos, este proceso se enlentece progresivamente hasta que se alcanza un nivel estable de corriente. Esta I_{Ca} residual aparece casi exclusivamente como "tail current", ya que la corriente durante el pulso desaparece prácticamente en su totalidad. En algunos experimentos (como por ejemplo al que pertenecen los registros de la Fig. 25) la cinética de deactivación de la "tail current" residual tras el "wash-out" fue más lenta. Esta observación, junto con la modificación de la curva conductancia-voltaje a potenciales negativos (entre -40 y 0 mV) en función del tiempo de lavado (fig. 27B), podría sugerir la existencia en las células tipo I de otro tipo de canales de Ca^{2+} aparte de los de alto umbral ya descritos en el apartado A de "RESULTADOS".

RESULTADOS

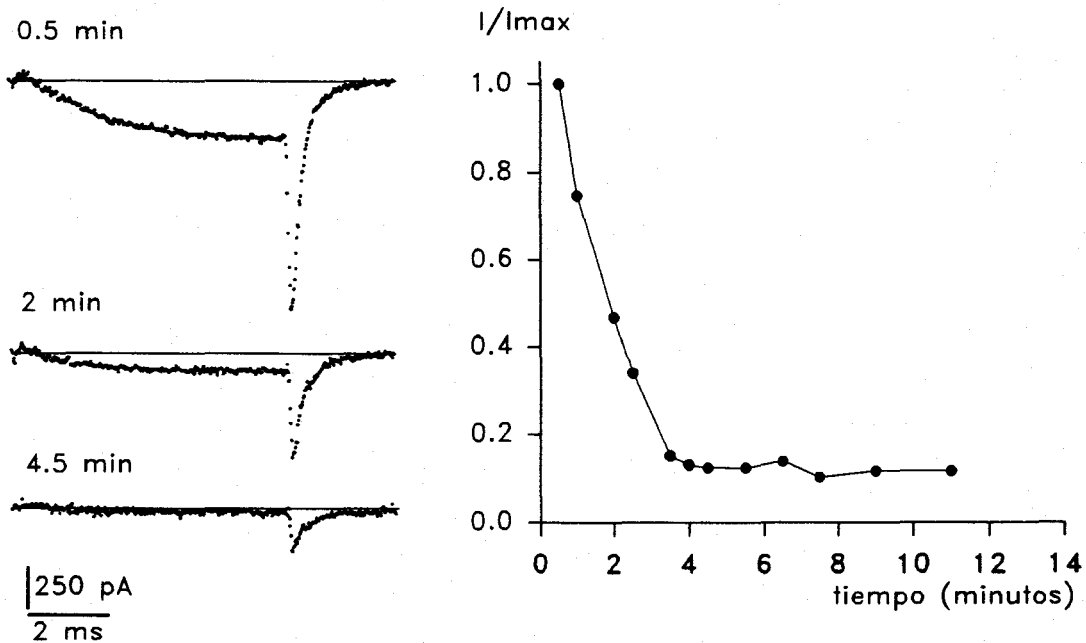


Figura 25. Lavado de la corriente de Ca^{2+} . Izquierda, registros de I_{Ca} en una célula con $10Ca//110Cs$, $20F$ y $150 nM Ca_i$ a los 0.5, 2 y 4.5 minutos de establecerse la configuración "whole-cell". Pulsos de 7 ms a +20 mV. Derecha, curso temporal de la desaparición de la corriente durante el registro. Los valores de amplitud de corriente están tomados en el instante de la repolarización ("tail current").

2. El Ca^{2+} intracelular favorece la desaparición de la corriente de calcio

En determinadas preparaciones el lavado de la I_{Ca} puede acelerarse activando repetidamente los canales de calcio y por otros factores que provocan una elevación del Ca^{2+} intracelular $[Ca^{2+}]_i$; de la misma forma puede retardarse eliminando el Ca^{2+} de la solución interna y añadiendo quelantes de este ion como EGTA (Byerly y Hagiwara, 1982; Fenwick et al, 1982; Forscher y Oxford, 1985).

RESULTADOS

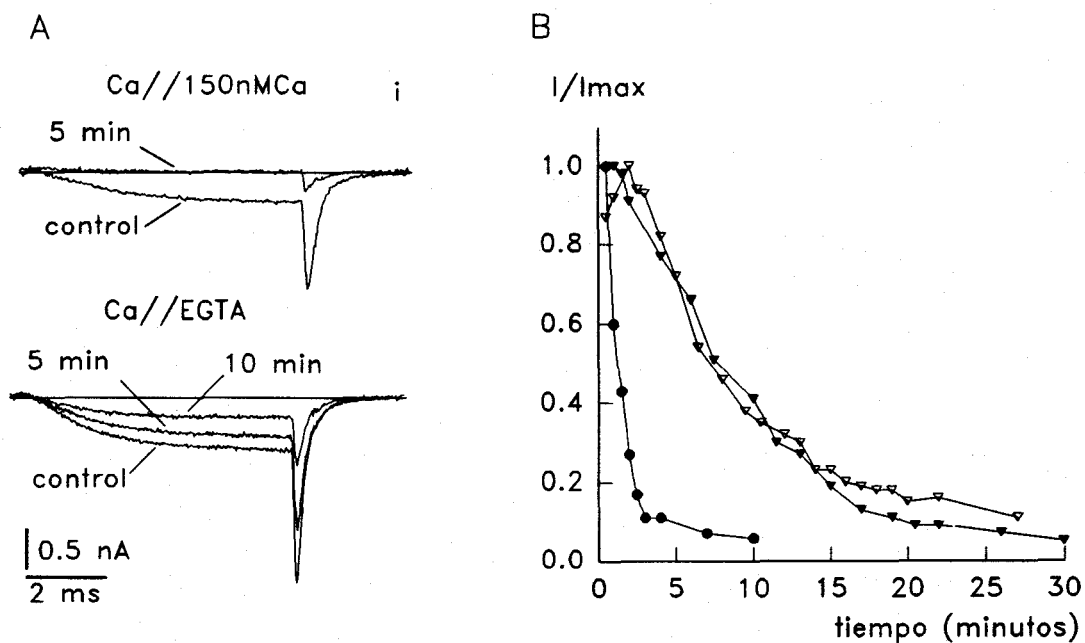


Figura 26. Participación del Ca_i en el lavado de la corriente de Ca^{2+} . A, trazados obtenidos con una solución interna con 150 nM Ca^{2+} (registro superior) y con 10 EGTA, sin calcio añadido (registro inferior). La solución externa es 10 mM Ca^{2+} en ambos casos. Pulsos de 7 ms a +20 mV. B, comparación del curso temporal del lavado de I_{Ca} con 150 nM Ca_i (círculos) y con 10 EGTA (triángulos claros) y BAPTA (triángulos oscuros).

La figura 26 demuestra la participación del $[Ca^{2+}]_i$ en el lavado de la I_{Ca} . En A los dos trazados corresponden a una célula con una concentración de 150 nM $[Ca^{2+}]_i$, donde la corriente desaparece casi totalmente a los 5 minutos de registro, de una forma similar a la célula de la figura 25. Este fenómeno fue menos acusado cuando se añadió a la solución interna un quelante de Ca^{2+} como EGTA (10 mM, concentración estimada de $Ca_i < 10^{-9}$ M), reduciéndose la I_{Ca} sólo un 30 % a los 5 minutos y un 52 % a los 10 minutos (trazado inferior de la figura 26A). En la gráfica de la figura 26B se comparan los cursos temporales del lavado de la corriente de Ca^{2+} en las dos condiciones anteriores. La rápida desaparición de la I_{Ca} con 150

RESULTADOS

nM $[Ca^{2+}]$, (círculos negros) se retrasó de forma acusada cuando el medio interno contenía 10mM EGTA (triángulos claros). El empleo de quelantes de Ca^{2+} más rápidos y potentes como BAPTA tuvieron un resultado similar al obtenido con EGTA (fig. 26B, 10 mM BAPTA, triángulos oscuros).

Con una concentración intracelular de Ca^{2+} menor de 10^{-9} M el proceso de lavado produce una disminución de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} pero la relación I-V y otros parámetros cinéticos no se modifican. Este hecho se ilustra en la figura 27A donde se han superpuesto las curvas I-V obtenidas al inicio del registro y a los 5, 10, 15 y 20 minutos. Estas gráficas muestran claramente que tanto el umbral de activación como el potencial (V_M) al que se produce la corriente máxima son constantes a lo largo del proceso de lavado. De forma similar, el curso temporal de la activación y la cinética de cierre no se modificaron significativamente con el lavado de la corriente, como se muestra en las figuras 27C y D, donde se han escalado y superpuesto las fases de activación (C) y de cierre (D) de los trazados obtenidos al inicio y a los 10 minutos de registro. Al igual que ocurre con los parámetros cinéticos, la relación conductancia-voltaje (Fig. 27 B) apenas se afecta durante el lavado, lo que indica que este proceso se debe principalmente a la disminución progresiva de canales de Ca^{2+} funcionalmente activos. A potenciales negativos se observó en algunas células un componente en la curva $G_{Ca}-V_M$ que se hace progresivamente más apreciable (Fig. 27 B). Este componente podría deberse a la existencia de una pequeña población de canales de bajo umbral de activación resistentes al lavado aunque, como se discute más adelante (ver "DISCUSION") su existencia en células glómicas no está confirmada (véase Ureña et al., 1989b).

RESULTADOS

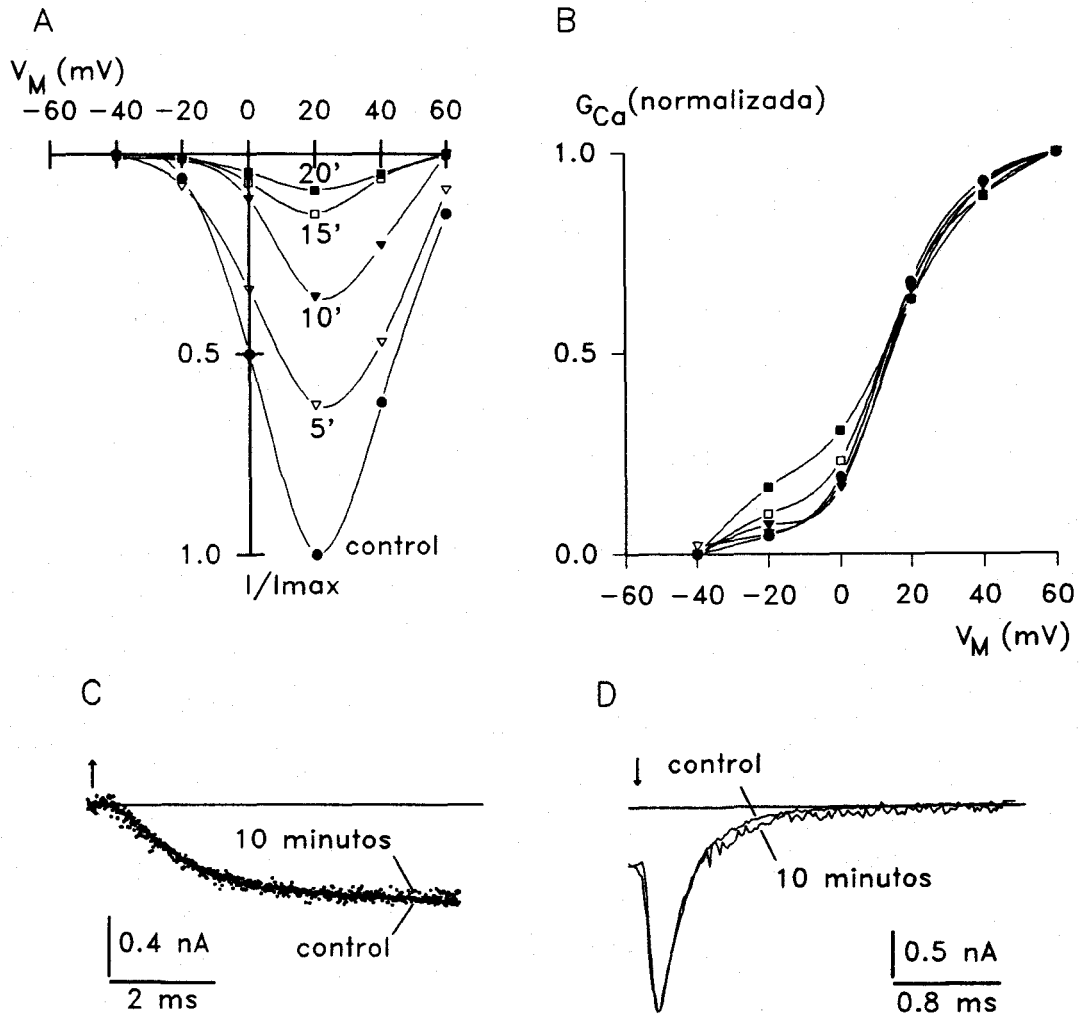


Figura 27. Parámetros voltaje-dependientes y cinéticos de la corriente de Ca^{2+} durante el lavado. A, relación corriente-voltaje al inicio del registro (control) y a los 5, 10, 15 y 20 min. B, curvas conductancia-voltaje superpuestas obtenidas en los mismos tiempos que en A. Nótese el aumento relativo de la conductancia a valores negativos de potencial conforme se va lavando la I_{Ca} . C y D, fases de activación y cierre de la corriente donde se han escalado y superpuesto los trazados del comienzo del registro y a los 10 min del mismo. Las flechas indican el comienzo (↑) y el final (↓) del pulso.

RESULTADOS

Con el fin de establecer la posible participación del Ca^{2+} extracelular en el proceso del lavado se realizaron dos tipos de experimentos, cuyos resultados se muestran en las figuras 28 A y B. En primer lugar se limitó el flujo de iones Ca^{2+} a través de los canales reduciendo el número de pulsos despolarizantes aplicados a la célula. En la figura 28A se muestra el curso temporal del lavado de I_{Ca} en una célula estimulada con sólo 4 pulsos de 7 ms de duración a +20 mV a lo largo de 18 minutos de registro. En estas condiciones el "wash-out" fue similar al observado en otros experimentos donde el número de pulsos aplicados fue diez veces superior. En segundo lugar, el curso temporal del lavado no se modificó de forma importante cuando se sustituyó el Ca^{2+} extracelular por Ba^{2+} ; con este último ion el proceso se enlenteció ligeramente en los primeros minutos de registro, pero a partir de los 15 minutos el porcentaje de corriente desaparecida era similar en ambos casos (Fig. 28B).

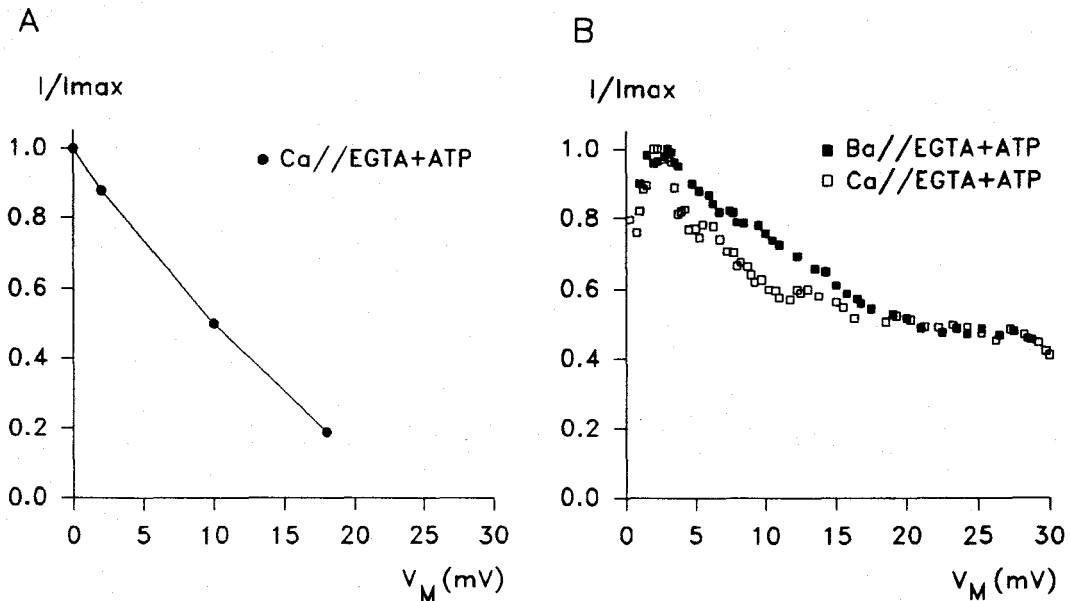


Figura 28. Papel del Ca^{2+} extracelular en el lavado de I_{Ca} . A, célula en la que se aplicaron 4 pulsos de potencial en 18 min de registro. B, lavado de I_{Ca} con Ca^{2+} (cuadrados claros) o Ba^{2+} (cuadrados oscuros) como transportadores de carga. Sol. 10Ca-Ba//110Cs-20F, EGTA+ATP.

RESULTADOS

Estos datos indican que el Ca^{2+} extracelular no interviene de forma significativa en el lavado de la corriente de Ca^{2+} en células glómicas, mientras que variaciones de la concentración intracelular de este ion en el rango nM son críticas para el mantenimiento de la integridad funcional de la corriente.

3. Los nucleótidos intracelulares previenen el lavado de la corriente de Ca^{2+}

La rapidez o lentitud con que difunde la solución de la pipeta al citosol al establecerse la configuración "whole-cell" está en función del tamaño del electrodo de registro y de la naturaleza de las moléculas que componen la solución intracelular (Marty y Neher, 1983). Durante la diálisis, el intercambio de iones como K^+ por Cs^+ es completo en pocos segundos, mientras que la dilución de moléculas de mayor tamaño ocurre en varios minutos (Byerly y Hagiwara, 1982). Puesto que la disminución de la corriente de Ca^{2+} durante el lavado sigue también un curso temporal de minutos, este proceso puede deberse a la pérdida de determinadas moléculas intracelulares que intervienen en el mantenimiento de la integridad de la I_{Ca} y que desaparecen durante la diálisis del citosol. Esta idea viene apoyada por el hecho de que en la configuración de parche escindido (modo "inside-out"), donde la membrana pierde contacto con el medio intracelular, el lavado de la corriente de Ca^{2+} es muy rápido, desapareciendo totalmente la I_{Ca} en menos de 2 minutos desde el inicio del registro (Fenwick et al, 1982; Armstrong y Eckert, 1987). En este sentido se ha descrito que el "wash-out" se puede retardar por moléculas que promueven la fosforilación enzimática de proteínas, como ATP, AMP_C , la proteína quinasa C y la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (Doroshenko et al, 1984; Forscher y Oxford, 1985; Armstrong y Eckert, 1987; Kaczmarek, 1987). En el presente estudio la adición de ATP-Mg a la solución interna produjo un notable enlentecimiento del lavado de la I_{Ca} .

RESULTADOS

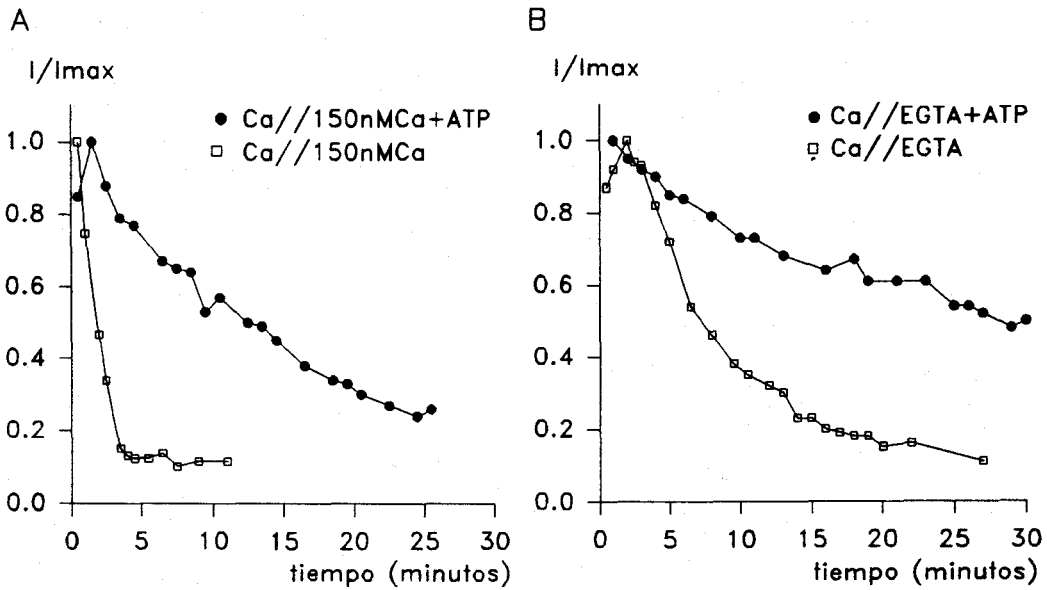


Figura 29. Enlentecimiento del lavado de I_{Ca} por ATP. A, la rápida desaparición de I_{Ca} con 150 nM Ca_i en la solución interna (cuadrados) se enlentece cuando se le añade 3 mM ATP-Mg (círculos). B, con 10 mM EGTA en la solución interna (cuadrados) la disminución de la corriente es más lenta en presencia de 3 mM ATP-Mg (círculos). Soluciones: 10Ca//110Cs, 20F.

En la figura 29A se muestra el efecto obtenido al añadir 3 mM ATP-Mg a una solución interna con 150nM $[Ca^{2+}]_i$. Mientras que en ausencia de ATP la I_{Ca} se redujo al 14 % en los primeros 5 minutos, en las mismas condiciones el ATP produjo una disminución importante del curso temporal del lavado registrándose un 80 % de la I_{Ca} inicial a los 5 minutos y un 54 % a los 10 minutos. El ATP-Mg produjo un enlentecimiento aún mayor del lavado cuando el $[Ca_i]$ en la solución intracelular se mantuvo por debajo de 10^{-9} M añadiendo 10 mM EGTA. Con esta última solución interna se mejoró notablemente el registro en comparación con las soluciones anteriores, manteniéndose un 80 % de la corriente inicial a los 5 minutos, un 70 % a los 10 y un 50 % a los 30 minutos (Fig. 29B). Los datos presentados en las gráficas de la figura 29 corresponden a células diferentes ya que la técnica

RESULTADOS

utilizada no permite el cambio de la solución de la pipeta una vez se consigue el sello.

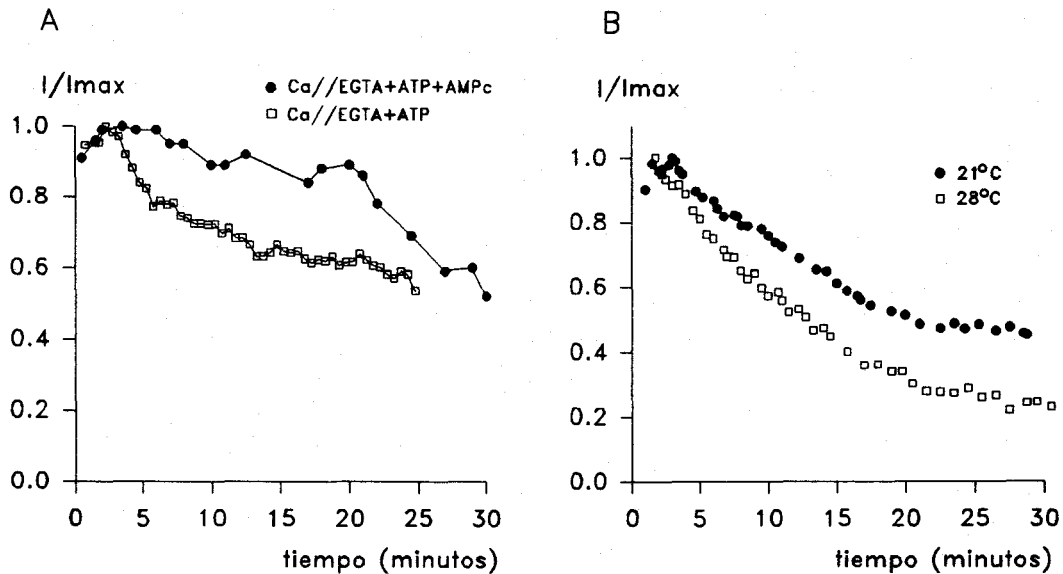


Figura 30. A, efecto de AMP_C sobre el lavado de I_{Ca} . El curso temporal del lavado registrado con la solución interna control con 10 mM EGTA y 3 mM ATP (cuadrados) se enlenteció al añadir 300 μM AMP_C (círculos). B, el aumento de temperatura ambiente durante el registro acelera el lavado. Círculos, 21 °C, cuadrados, 28 °C; soluciones 10Ca//130Cs, 10 EGTA y 3 ATP en ambos casos.

Además del ATP, se ha estudiado el efecto de otros agentes fosforilantes intracelulares sobre el "wash-out" de la I_{Ca} . En la Fig. 30 A se muestra el efecto del AMP_C , la acción de otros agentes se ilustra en el apartado siguiente. El AMP_C (300 μM) añadido a una solución interna con 10 mM EGTA y 3 mM ATP-Mg consiguió enlentecer el lavado de forma mucho más eficaz que solamente con EGTA + ATP, ya que se mantuvo el 90 % de la corriente de Ca^{2+} a los 20 minutos de perfusión. La acción sinérgica del AMP_C podría deberse a un efecto directo sobre la proteína que forma el canal o bien a la activación de otra/s molécula/s como la proteína quinasa A, cuya acción sobre la corriente de Ca^{2+} se detalla en el siguiente apartado.

RESULTADOS

El hecho de que el lavado se acelere con el aumento de la temperatura a la que se encuentra la célula (ver Fig. 30B) y la forma en que diferentes factores exógenos regulan la I_{Ca} apoyan la hipótesis del control metabólico del canal de Ca^{2+} para mantener su función.

Las soluciones internas empleadas en la mayoría de los experimentos donde se registró la corriente de Ca^{2+} contenían 20 mM CsF, ya que es conocido que el flúor favorece la formación y la estabilidad del sello durante el registro (Matteson y Armstrong, 1986). Por otra parte, se ha descrito que las proteínas G pueden activarse por fluoruro unido a aluminio (AlF^4 ; Gilman, 1987). Dado que diferentes enzimas intracelulares están reguladas por proteínas G, el efecto de nucleótidos intracelulares y agentes fosforilantes sobre el lavado de I_{Ca} podría verse contaminado por la activación permanente de dicha familia de proteínas. Aunque en nuestras condiciones experimentales esta superposición de efectos es improbable, ya que se utilizó una concentración muy alta de EGTA (10 mM) y por lo tanto no es de esperar que la concentración de Al^{3+} libre sea la suficiente como para activar proteínas G, se realizó un estudio comparativo con el fin de determinar si el flúor intracelular interviene en el proceso del lavado de I_{Ca} . Los resultados del análisis de 37 células se presentan en la tabla IV en forma de porcentaje de corriente que se mantiene a los 5, 10 y 20 minutos de diálisis con soluciones con o sin flúor. Como se observa en la tabla, no hubo diferencias significativas comparando las dos condiciones. La composición de las soluciones fue (en mM) 10 $BaCl_2$ // 130 CsCl, 10 EGTA, 2 $MgCl_2$, 10 Hepes y 3 ATP, sustituyéndose 20 mM CsCl por CsF en la solución con flúor.

RESULTADOS

Tabla IV. I_{Ba} (%) observada a los 5, 10 y 20 min de registro con soluciones internas con y sin flúor.

Solución interna	5 minutos	10 minutos	20 minutos
130 CsCl, 10 EGTA+3 ATP	79.4 ± 7.9 (19)	66.9 ± 9.7 (18)	52.3 ± 13.3 (10)
110 CsCl, 20F, 10 EGTA+3 ATP	82.7 ± 8.7 (18)	70.4 ± 9.1 (19)	54.7 ± 16.8 (13)

Solución externa con 10 mM Ba en los dos casos. Las soluciones se expresan en mmol/l.

Los datos son media ± desviación estándar. Entre paréntesis se indica el número de observaciones en cada caso.

4. La funcionalidad del canal de Ca^{2+} depende del equilibrio entre fosforilación y desfosforilación

Se ha descrito que la actividad de los canales de Ca^{2+} perdida durante el proceso del lavado se puede restaurar y mantener añadiendo la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (Doroshenko et al, 1984; Armstrong y Eckert, 1987). Sin embargo, en ciertas células la fosforilación de canales de Ca^{2+} no se acompaña de la elevación de los niveles intracelulares de AMP_c , y la regulación funcional parece estar mediada por otro tipo de enzimas como proteína quinasa C, proteína quinasa dependiente de GMP_c y la proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina (véase revisión de Kaczmarek, 1988).

Los ésteres de forbol y los diacilgliceroles sintéticos activan la proteína quinasa C (PKC) estimulando su acción enzimática (Kaczmarek, 1987) y producen un aumento de la corriente de Ca^{2+} en ciertas células (DeRiemer et al, 1985). Con el fin de conocer si la PKC interviene en el proceso de regulación metabólica de la corriente de Ca^{2+} en las células tipo I, éstas se incubaron con

RESULTADOS

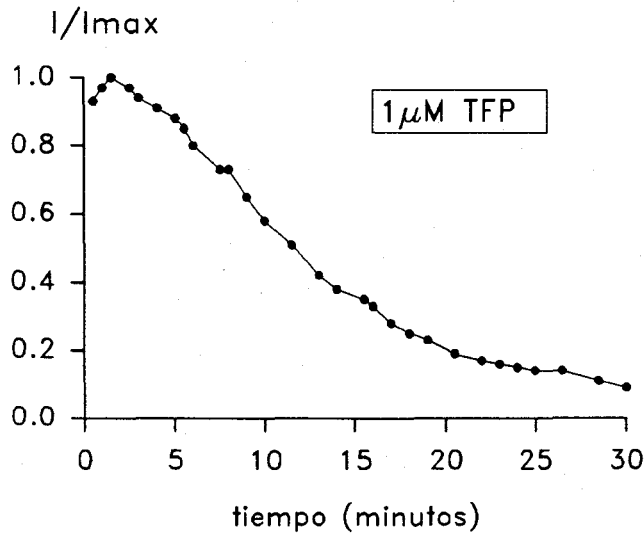


Figura 31. Curso temporal del lavado de I_{Ca} con una solución interna que contiene 10 mM EGTA y 1 μ M trifluorperacina (TFP), un inhibidor de la calmodulina. La solución interna no contiene ATP-Mg. Soluciones: 10 Ca//110Cs, 20F.

un éster de forbol (TPA; 12-0-tetradecanoil-13-acetato) a una concentración 100 nM durante dos horas antes del registro. Tras esta manipulación experimental ni la amplitud de la corriente de Ca^{2+} ni el curso temporal del lavado se afectaron de forma apreciable.

Para que la fosforilación de proteínas debida al efecto de mensajeros intracelulares como Ca^{2+} y AMP_c funcione como un sistema reversible de señalización, son necesarios una serie de enzimas que desfosforilen de forma rápida las proteínas y terminen la respuesta inducida por el mensajero. Se conocen varios tipos de fosfatasas de proteínas en músculo esquelético, neuronas y células neurosecretores (Ingebritsen y Cohen, 1983; Armstrong, 1989), algunas de ellas moduladas por mensajeros intracelulares. Una de estas fosfatasas es la calcineurina (o fosfatasa tipo 2) que es dependiente de Ca^{2+} intracelular y está regulada por la calmodulina. Con objeto de determinar en nuestro estudio si el lavado de la I_{Ca} es consecuencia del efecto de una fosfatasa del tipo anterior se empleó trifluorperacina

RESULTADOS

(TFP), un inhibidor de la calmodulina, aplicado intracelularmente en concentración 1 μM . En la figura 31 se muestra el curso temporal completo del lavado de la corriente de Ca^{2+} en una célula cuya solución interna contenía 10 mM EGTA y 1 μM TFP, sin ATP añadido. El lavado se enlenteció comparado con la solución control sin TFP (ver tabla V) pero no consiguió evitarse en su totalidad. Por lo tanto, debe existir junto con la defosforilación, otro sistema enzimático con el efecto contrario que participe en la regulación metabólica del canal de Ca^{2+} . Los efectos del ATP y AMP_c descritos anteriormente sugieren que en nuestra preparación la quinasa A, dependiente de AMP_c , participa en el mantenimiento funcional de los canales de Ca^{2+} .

En el presente trabajo, la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMP_c (PKA_c) aplicada intracelularmente (10 ng/ml) junto con 3 mM ATP-Mg mostró ser la combinación más eficaz en la prevención del lavado de la corriente de Ca^{2+} , superando los resultados obtenidos en todas las condiciones experimentales anteriores. A los 15 minutos de registro se mantenía el 90 % de la I_{Ca} inicial, y a los 30 minutos el 75 %, como se observa en la gráfica de la figura 32A (círculos negros). La composición de la solución interna cuyo efecto se asemeja más al de la PKA_c fue 10 mM EGTA + 4 mM ATP-Mg (fig. 32A, círculos blancos). Las figuras 32 B y C muestran, respectivamente, las curvas I-V y G_{Ca} -V obtenidas a tiempos distintos desde el inicio de la diálisis. En la primera de las curvas se observa la disminución en amplitud de I_{Ca} a los 10, 20, 30 y 40 minutos de registro, sin que se modifique el umbral de activación o el potencial al que se alcanza la amplitud máxima. En la figura 32C se han superpuesto las curvas de la relación conductancia-voltaje en la situación control y las obtenidas a los 10, 20, 30 y 40 minutos de registro, sin que se aprecien comparativamente modificaciones importantes. Estos datos apoyan la hipótesis de que el "wash-out" se debe a una

RESULTADOS

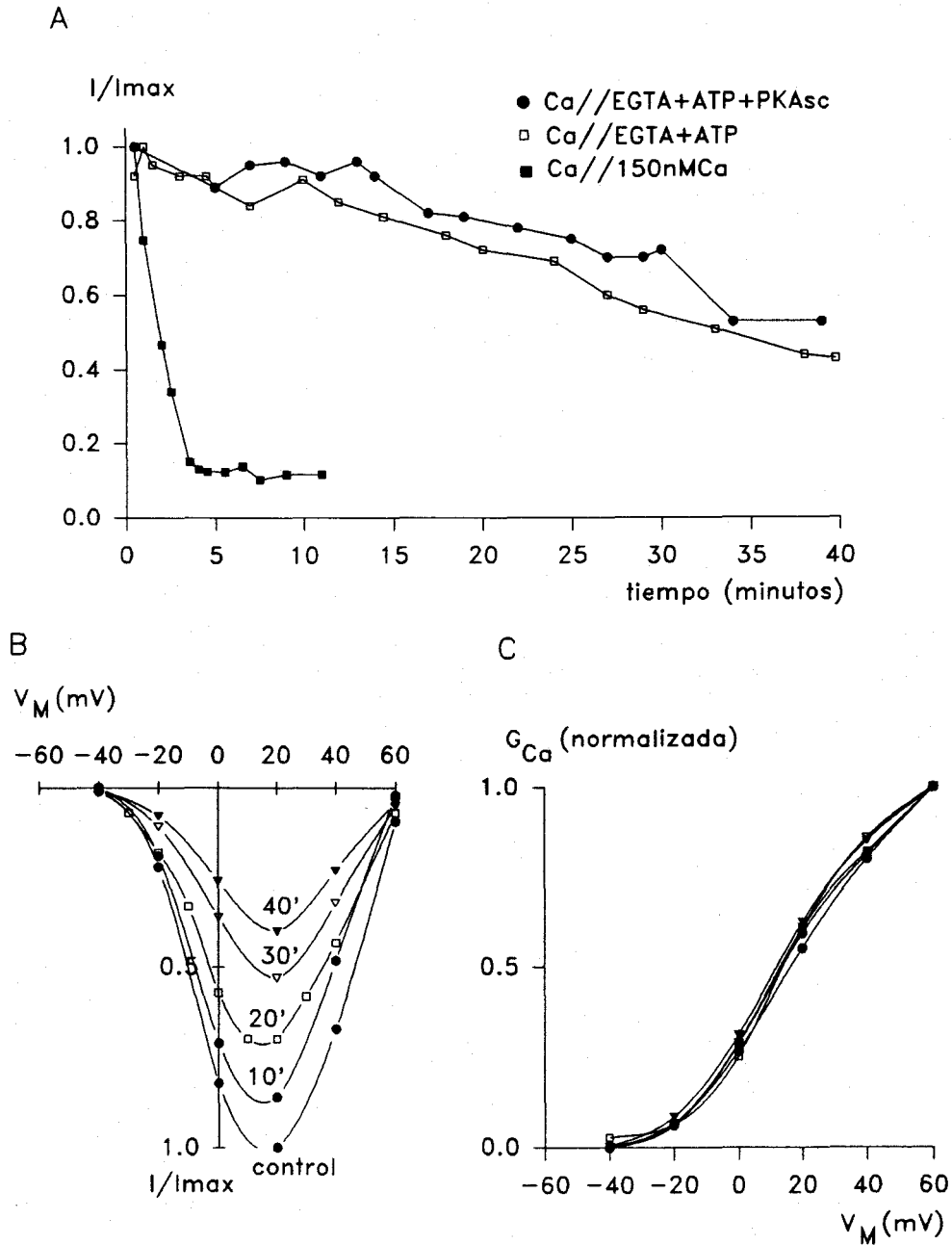


Figura 32. A, la aplicación intracelular de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (PKA_{sc}) reduce en gran medida el lavado de I_{Ca} (círculos) comparado con las condiciones iniciales de registro (150 nM Ca , sin EGTA ni ATP; cuadrados claros). La combinación 10 mM EGTA y 4 mM ATP en la solución interna es la que consigue un efecto más parecido al de la PKA_{sc} . B, curvas I-V obtenidas al inicio y a los 10, 20, 30 y 40 min de registro. C, relaciones conductancia-voltaje tomadas en los mismos tiempos que en B. Soluciones, 10 Ca //110Cs, 20F.

RESULTADOS

disminución de la población de canales activos más que a cambios en su comportamiento electrofisiológico. Dados los resultados obtenidos, las soluciones internas que incluyen EGTA + ATP y PKA_c son las condiciones ideales en las se consigue un mayor retraso del lavado de la I_{Ca} en los experimentos. El uso de la PKA presenta algunos inconvenientes como la dificultad de manejo y lo costoso de su aplicación, razones por las que se eligió la combinación EGTA+ATP para retrasar el "wash-out" en los estudios donde se requirió una corriente de Ca²⁺ estable en el tiempo.

La tabla V muestra, a modo de resumen, el efecto sobre el lavado de la corriente de Ca²⁺ en las diferentes condiciones de registro con las soluciones internas utilizadas en cada caso a lo largo de este estudio. Los valores indican el porcentaje de la corriente que se mantiene íntegra respecto de la inicial a los 5, 10 y 20 minutos tras el establecimiento de la configuración de "whole-cell" en un total de 49 células.

Los datos que se han mostrado en los párrafos anteriores indican que la regulación metabólica de la corriente de Ca²⁺ de la células glómicas se debe al equilibrio entre fosforilación y desfosforilación de las proteínas que forman el canal. La acción de determinadas moléculas (fundamentalmente ATP, AMP_c y proteína quinasa A) mantienen fosforilados los canales de Ca²⁺, estado que es necesario para mantener su función. Aunque el proceso del "wash-out" se consiguió enlentecer en gran medida con los agentes descritos más arriba, incluso en las mejores condiciones no se pudo evitar la desaparición de parte de la corriente de Ca²⁺ a lo largo del registro (ver "DISCUSION").

RESULTADOS

Tabla IV. Porcentaje de $I_{Ca/Ba}$ observada respecto del valor máximo a los 5, 10 y 20 minutos de registro con diferentes soluciones.

Soluciones de registro externas//internas	$I_{Ca/Ba}$ (%) a los 5 minutos	$I_{Ca/Ba}$ (%) a los 10 minutos	$I_{Ca/Ba}$ (%) a los 20 minutos
10 Ca//150nM Ca	13.5 ± 3.1 (4)	8.8 ± 4 (2)	—
10Ca//150 nM Ca + ATP	66.2 ± 15 (5)	49.6 ± 18.9 (5)	33.2 (1)
10 Ca//10 EGTA-BAPTA	73.0 ± 4.7 (4)	43.2 ± 10.5 (3)	14 ± 2.6 (3)
10 Ca//10 EGTA + TFP	88.1 (1)	58.1 (1)	20.0 (1)
10 Ca//10 EGTA + ATP	85.6 ± 9.3 (9)	71.8 ± 10.1 (8)	60.6 ± 11.2 (6)
10 Ca//10 BAPTA + ATP	87.1 ± 18 (2)	76.5 ± 46.2 (2)	—
10 Ba//10 EGTA + ATP	82.7 ± 9.1 (18)	70.4 ± 9.1 (19)	54.7 ± 16.81 (13)
10 Ca//10 EGTA + ATP + AMP _c	95.5 ± 4.9 (3)	74.5 ± 20.5 (3)	68.5 ± 21.5 (3)
10 Ca//10 EGTA + ATP + PKA _c	95.6 ± 0.7 (3)	93.5 ± 3.5 (2)	71.1 ± 1.4 (2)

Los valores de las soluciones se expresan en mmol/l

ATP-Mg 3-4 mM; AMP_c 0.3 mM; TFP 1 μM.

Las soluciones internas contienen 20 mM FCs (véase tabla IV). En las soluciones con 10 EGTA o 10 BAPTA la $[Ca_i]$ estimada es $<10^9 M$

Los valores de los datos experimentales indican media \pm DE; entre paréntesis se indica el número de observaciones en cada caso

E) MODULACION DE LA CORRIENTE DE Ca^{2+} POR CATECOLAMINAS

Las células tipo I del cuerpo carotídeo liberan acetilcolina, catecolaminas (principalmente dopamina) y varios neuropéptidos como respuesta a la estimulación quimiosensorial (Eyzaguirre y Zapata, 1984; Fidone y González, 1986). La secreción como respuesta a la hipoxia es, como en otros sistemas secretores, dependiente de Ca^{2+} extracelular (Fidone et al., 1982a; Fishman et al., 1985; Almaraz et al., 1986). Aunque es conocido que las células glómicas poseen autoreceptores para acetilcolina (ACh) y catecolaminas (CA) (Dinger et al., 1981, 1986), su posible significación fisiológica no ha sido bien estudiada. En algunos trabajos previos se ha mostrado que los neurotransmisores presentes en el cuerpo carotídeo modifican las propiedades eléctricas pasivas de las células glómicas (Goldman y Eyzaguirre, 1984; Eyzaguirre et al., 1990), sin embargo no existe información sobre el efecto de estas sustancias sobre las conductancias iónicas de las células quimiorreceptoras. En este apartado se muestra el efecto de dos catecolaminas, dopamina (DA) y noradrenalina (NA), sobre las conductancias iónicas de las células tipo I y se analizan los posibles mecanismos que intervienen en su modulación.

1. La dopamina inhibe de forma selectiva y reversible la corriente de Ca^{2+}

El efecto de la DA aplicada externamente sobre las diferentes corrientes iónicas de las células quimiosensoras se ilustra en la figura 33. A y B son, respectivamente, trazados superpuestos de corrientes de K^+ y Na^+ registradas en la situación control (C) y en presencia de $1 \mu\text{M}$ dopamina (DA). En ninguno de los dos casos se observa una modificación apreciable de la corriente. Por el contrario, el mismo protocolo experimental produjo una disminución de I_{Ca} de $\approx 60\%$ del valor inicial (Fig. 33C). El efecto de la DA es perfectamente reversible y afecta tanto a la corriente durante el pulso como al "tail current" una vez que se produce la repolarización. Para facilitar la comparación, el trazado control (C) y el que se obtiene tras el lavado de la DA (recuperación, R) se muestran superpuestos.

RESULTADOS

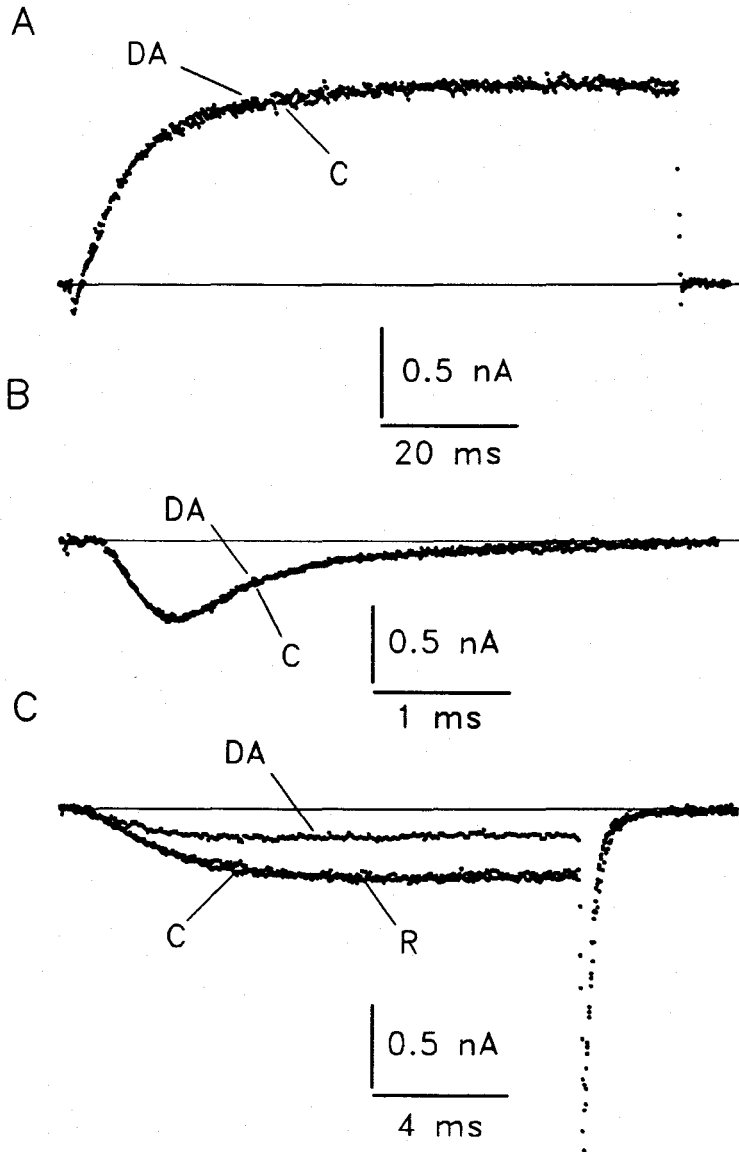


Figura 33. Efecto bloqueante selectivo y reversible de dopamina (DA). A y B, trazados superpuestos de corrientes de K^+ y Na^+ registradas en situación control (C) y al añadir $1 \mu M$ dopamina (DA). Pulsos de 90 ms a $+40$ mV (A) y de 5 ms a 0 mV (B). C, trazados control (C) y en presencia de dopamina (DA) de I_{Ca} . El efecto inhibitorio de DA es recuperable (R). Pulsos de 15 ms a $+10$ mV. Soluciones: A y B, 10Ca//130K; C, 10Ba//110Cs, 20F, EGTA + ATP-Mg.

RESULTADOS

Un efecto cualitativamente similar al descrito anteriormente se observó en las 62 células estudiadas expuestas a concentraciones de DA que varían en varios órdenes de magnitud (entre 10^{-12} y 10^{-5} M). Los experimentos sobre la modulación de los canales de Ca^{2+} por DA se realizaron generalmente utilizando 10 mM Ba^{2+} en la solución externa y soluciones internas con 10 mM EGTA y 4 mM ATP-Mg, ya que, como se describió en el apartado D de "RESULTADOS", con estas soluciones se retrasa sensiblemente el lavado de los canales de Ca^{2+} . Estas condiciones favorecen el registro de una corriente estable y permiten el estudio del efecto modulador de los transmisores. El efecto de la DA sobre la corriente de Ca^{2+} fue cualitativamente similar al mostrado en la figura 33 cuando se utilizó Ca^{2+} extracelular como transportador de carga o cuando se usaron soluciones internas con concentraciones de Ca^{2+} superiores.

La inhibición de la corriente de Ba^{2+} (I_{Ba}) por DA es rápida y sigue el mismo curso temporal que el recambio de las soluciones externas en la cámara de registro. La figura 34 ilustra en una célula el efecto de DA 10 μM sobre I_{Ba} así como el protocolo experimental seguido en la mayoría de los experimentos. En todas las células expuestas a DA se midió la amplitud de I_{Ba} (medida al final de pulsos de 6 a 20 ms) y se contruyó una gráfica similar a la que se muestra en la figura 34B. Generalmente el experimento se inició con 10 mM Ca^{2+} externo y tras dos o tres minutos se cambió a la solución con 10 mM Ba^{2+} (este cambio se indica con una flecha en la figura). Una vez estabilizada I_{Ba} , la aplicación de 10 μM DA (el tiempo de aplicación se indica por la barra horizontal) produjo una atenuación rápida y reversible en la amplitud de la corriente. Durante el tiempo de aplicación de DA el efecto inhibitorio no fue mantenido, sino transitorio, recuperándose parte de la corriente cuando el neurotransmisor se encontraba todavía en la solución externa. Esta observación se analiza con detalle en el punto 4 de este apartado. Ejemplos de barridos con I_{Ba} generada por despolarizaciones a +20 mV antes (C), durante (DA) y tras (R) la aplicación de DA se muestran en el panel A de la figura 34.

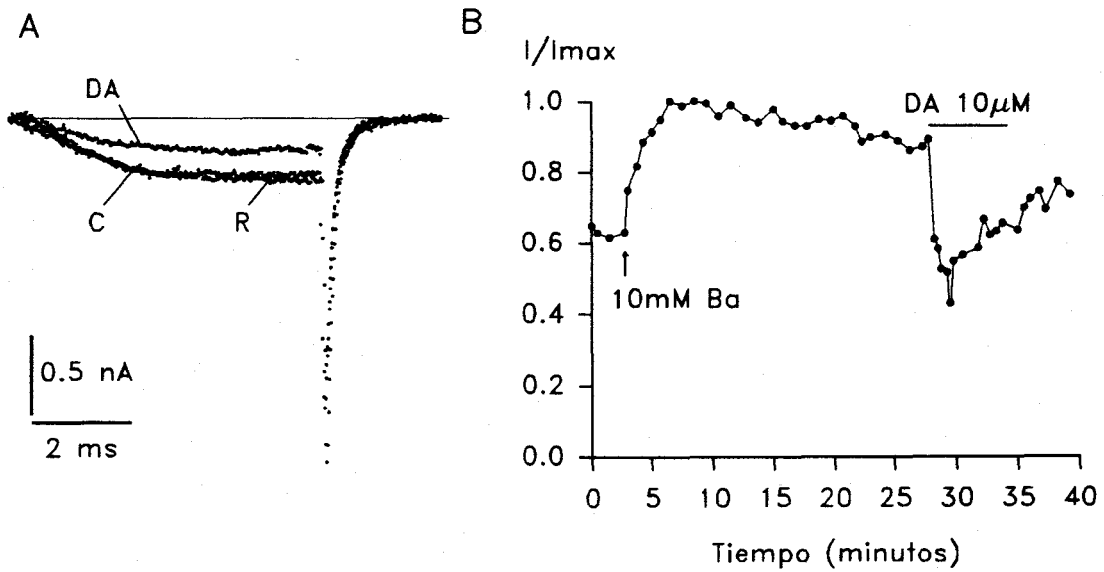


Figura 34. Inhibición de la corriente de Ba^{2+} por dopamina. A, trazados superpuestos antes (C), durante (DA) y después (R) de la aplicación de DA $10 \mu M$. Pulsos de 7 ms a +10 mV. B, curso temporal del efecto de DA. El registro se inició en una solución externa con 10 mM Ca^{2+} , cambiando a los 3 minutos a 10 mM Ba^{2+} (flecha de la figura). La barra horizontal indica el tiempo de aplicación de DA. Soluciones, 10Ba//110Cs, 20F, EGTA, ATP.

2. La disminución de la corriente de Ca^{2+} por dopamina se debe a una reducción en el número de canales funcionales

Con el fin de determinar si la DA ejerce su acción modificando las propiedades electrofisiológicas de la corriente de Ca^{2+} se analizaron sus características cinéticas y los parámetros voltaje-dependientes durante la aplicación del neurotransmisor. Los resultados se muestran en las figuras 35 y 36. En la relación corriente-voltaje (Fig. 35A) se aprecia una disminución de la amplitud de la corriente en presencia de dopamina $1 \mu M$ (triángulos) frente al registro con solución control (círculos oscuros), mientras que el umbral de activación y el nivel de potencial (V_M) al que se produce el pico máximo de intensidad se mantienen constantes. De igual forma, la relación conductancia-voltaje normalizada en la

RESULTADOS

situación control con 10mM Ba^{2+} (círculos claros), y después de añadir 1 μ M dopamina (círculos oscuros) no se modifica (Fig. 35 B). Los datos representan la amplitud de la corriente de cierre en pulsos de 7 ms de duración al repolarizar la célula a -80 mV. Las dos curvas son prácticamente similares, lo que indica que la inhibición de la corriente de Ca^{2+} causada por la dopamina es independiente del potencial de membrana.

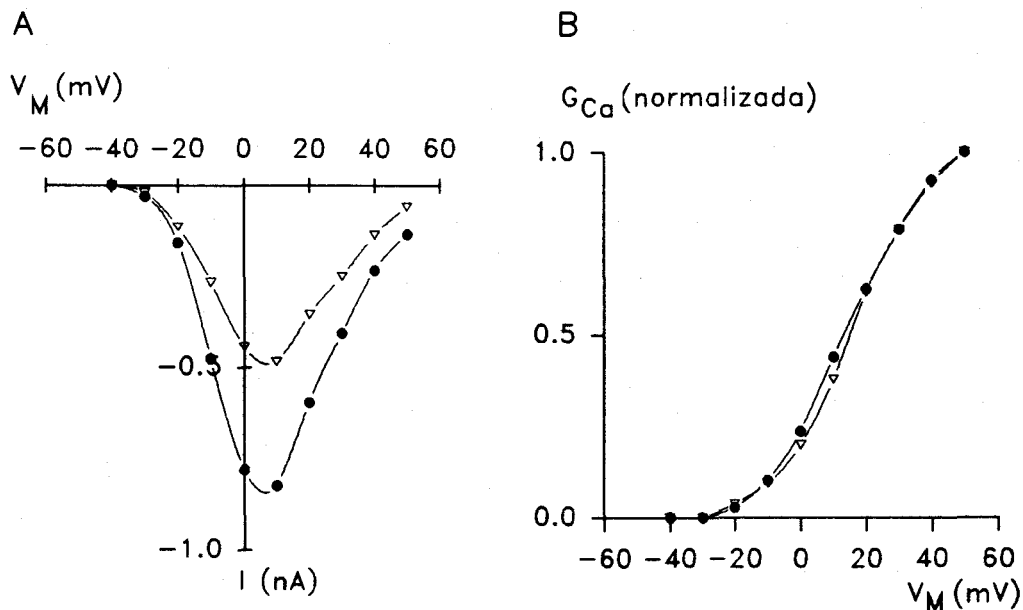


Figura 35. Efecto de dopamina sobre los parámetros voltaje-dependientes de I_{Ba} . A, relación corriente-voltaje en situación control (círculos) y en presencia de 1 μ M DA. B, curva conductancia-voltaje normalizada control (círculos) y con 1 μ M DA (triángulos). Soluciones, 10Ba//110Cs, 20F, EGTA y ATP.

En la figura 36 A y B se han superpuesto los trazados obtenidos en situación control con 10mM Ba^{2+} en la solución externa (C en la figura) y tras añadir 1 μ M dopamina (DA). A y B son registros de células diferentes obtenidos con

RESULTADOS

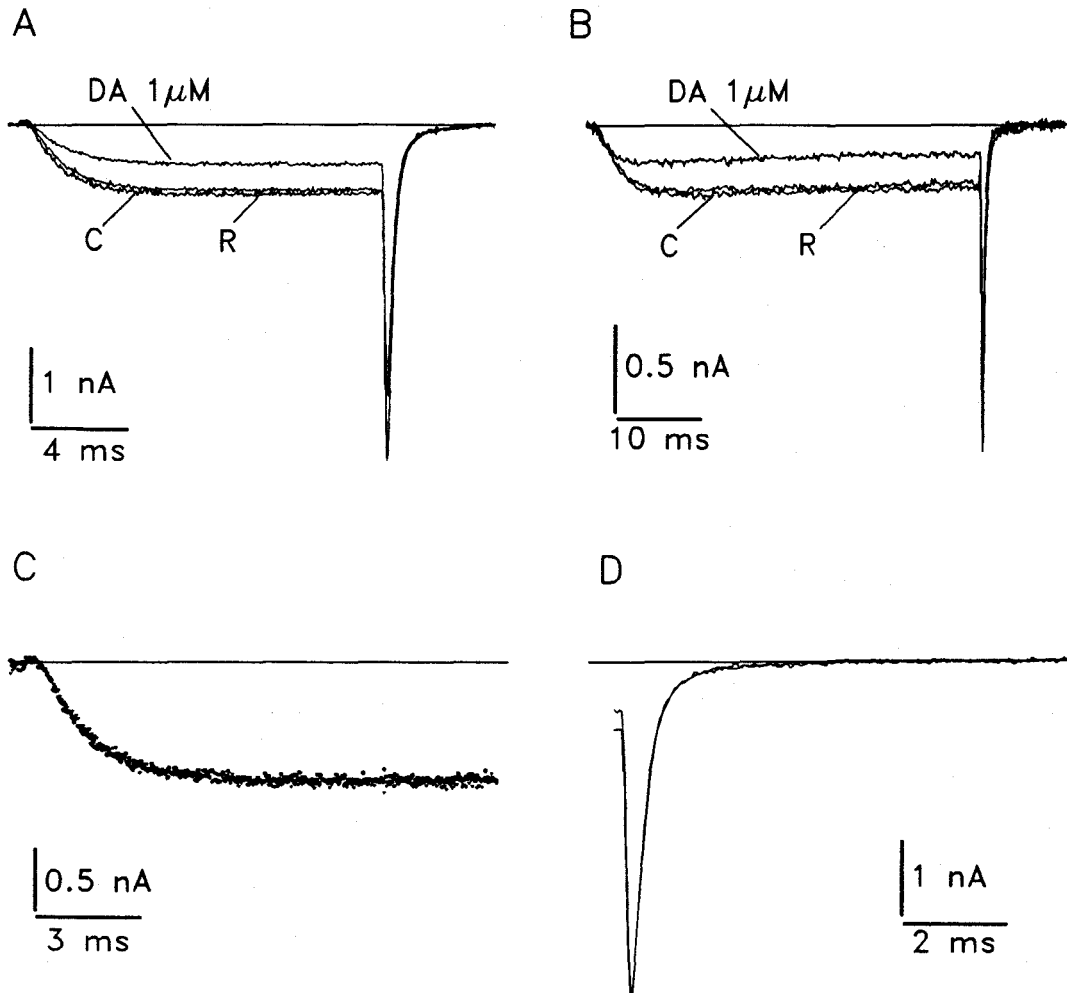


Figura 36. Análisis de los parámetros cinéticos al aplicar DA. A y B, registros de I_{Ba} de 15 y 40 ms de duración respectivamente en situación control (C), en presencia de $1 \mu\text{M}$ DA y tras la recuperación (R). Pulsos a $+10$ mV. C y D, fase de activación y cinética de cierre de I_{Ba} . Los trazados control y con DA están escalados y superpuestos para mostrar que no hay diferencias entre ellos. Soluciones $10 \text{ Ba} // 110 \text{ Cs}$, 20 F , EGTA, ATP.

pulsos desde -80 a $+10$ mV de 15 (A) y 40 (B) ms de duración. En ellos se observa que la dopamina no modifica la inactivación ni ninguna otra característica de la corriente, salvo la disminución de amplitud durante el pulso y en la "tail current". En la figura 36C se muestra el curso temporal de la activación superponiendo los

RESULTADOS

trazados control y el obtenido con dopamina de la figura 36A, escalando éste último por un factor de 1.62 frente al control. La cinética de activación es idéntica en ambas condiciones, al igual que ocurre con la cinética de cierre, escalada en la figura 36D y donde los trazados control y con dopamina son indistinguibles. Los resultados indican que la dopamina no modifica las cinéticas de activación y de desactivación de la I_{Ca} ni la dependencia de potencial de la conductancia para Ca^{2+} . Estas observaciones sugieren que el neurotransmisor inhibe la corriente de Ca^{2+} disminuyendo el número de canales que se abren con la despolarización.

3. La dopamina ejerce su efecto modulador a concentraciones en el rango subnanomolar

Las células glómicas parecen ser muy sensibles a la acción de DA ya que se consiguió una disminución apreciable de I_{Ba} a concentraciones subnanomolar e incluso picomolar. En la mayoría de los experimentos la acción de la DA fue total o parcialmente reversible, lo que descarta que el efecto pueda explicarse por el lavado de los canales de Ca^{2+} ; sí es posible que la recuperación parcial en algunos experimentos se deba al progresivo lavado de canales de Ca^{2+} y a la disminución irreversible de I_{Ba} . En la figura 37 se compara el efecto de tres concentraciones diferentes de DA (en todos los casos con recuperación casi completa) sobre I_{Ba} , donde (C) es el registro control, (DA) durante la aplicación de dopamina y (R) en la recuperación. En la tabla VI se resumen los efectos de diferentes concentraciones de dopamina con datos obtenidos de 32 células distintas. Sorprendentemente, concentraciones en el rango pM tienen un efecto ($56.4\% \pm 6.5\%$) netamente superior al que se observa con concentraciones muy superiores ($39.9\% \pm 6.4\%$, en el rango μM). Este hecho posiblemente se debe a que, como se indicó anteriormente, la aplicación de dopamina no fue instantánea sino que el recambio de solución externa requirió al menos 15 a 20 s y por lo tanto con concentraciones elevadas se produce una desensibilización rápida de los receptores o de los mecanismos

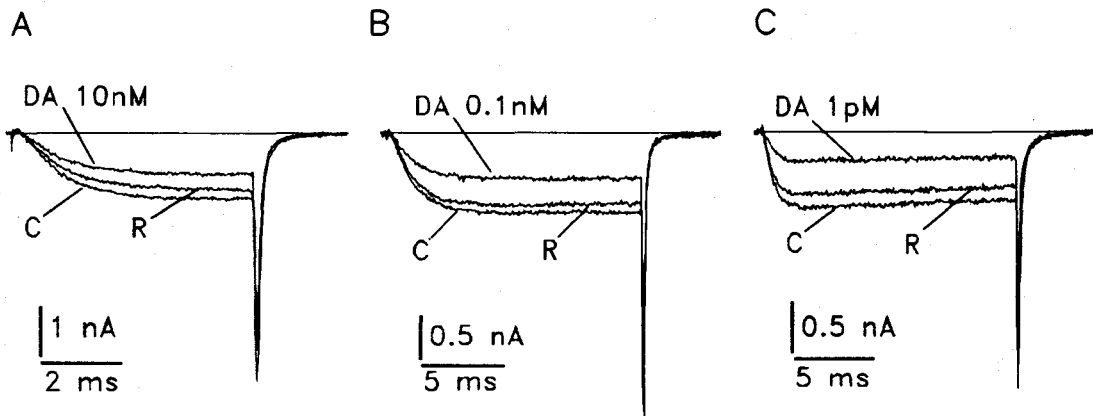


Figura 37. Efecto de DA a diferentes concentraciones. A, trazados obtenidos antes (C), durante (DA) y después (R) de aplicar 10 nM dopamina. Pulso de 6 ms de duración a + 10 mV. B y C son idénticas condiciones experimentales con menores concentraciones de DA: 0.1 nM y DA 1 pM, respectivamente. Pulsos de 15 ms a +10 mV (B) y +20mV (C). Soluciones: 10Ba//110Cs, 20F.

Tabla VI. Efecto de diferentes concentraciones de dopamina sobre I_{Ba} (valores obtenidos con la primera exposición a DA).

Concentración de dopamina	Reducción máxima de I_{Ba} en % (media \pm DE)	(n)
10 μ M	36.3 \pm 9.5	(7)
1 μ M	39.9 \pm 6.4	(8)
1-10 nM	43.5 \pm 7	(7)
0.1 nM	50.4 \pm 11.7	(6)
1-10 pM	56.4 \pm 6.5	(4)

Los valores se indican como media \pm DE. Entre paréntesis, n° de observaciones.

RESULTADOS

intermedios que acoplan los receptores a los canales de Ca^{2+} . Este fenómeno es más aparente conforme aumenta la concentración de agonista. Esta observación y la transitoriedad en el efecto de la dopamina (ver más abajo) impide un estudio detallado de la curva dosis-respuesta. En cualquier caso nuestros datos sugieren que el receptor para la dopamina en células glómicas es de muy alta afinidad con una constante de disociación (K_d) en el rango 1-10 pM.

4. El efecto de la dopamina es transitorio debido a un fenómeno de desensibilización

La disminución de la corriente de Ca^{2+} por dopamina puede repetirse en la misma célula aplicando nuevamente el transmisor, aunque a una concentración determinada la magnitud del efecto es cada vez menor y la recuperación más incompleta. Este hecho puede observarse en la gráfica de la figura 38B, donde la I_{Ba} se redujo un 57 % durante la primera exposición a 2 μM dopamina pero sólo un 43.6 % y un 32 % en las exposiciones sucesivas. A la izquierda de la figura se han superpuesto los trazados obtenidos antes (C), durante (DA) y después (R) de aplicar dopamina, tomados durante la primera exposición al neurotransmisor. Este fenómeno, que se observó en todas las células en las que la dopamina, a concentraciones variables, se aplicó de forma repetida, puede deberse al gasto de metabolitos intracelulares como consecuencia de la activación repetida de los mecanismos por los que ésta ejerce su efecto. Adicionalmente, es posible que sea también el resultado de la acumulación de la desensibilización del receptor de dopamina, fenómeno que se describe en los párrafos que siguen.

Como se indicó más arriba, una observación interesante en la acción de la dopamina es que cuando este agente se aplicó de forma mantenida el efecto inhibitorio máximo disminuyó progresivamente conforme transcurría el tiempo de aplicación, llegándose a una recuperación parcial, e incluso total, de la amplitud de

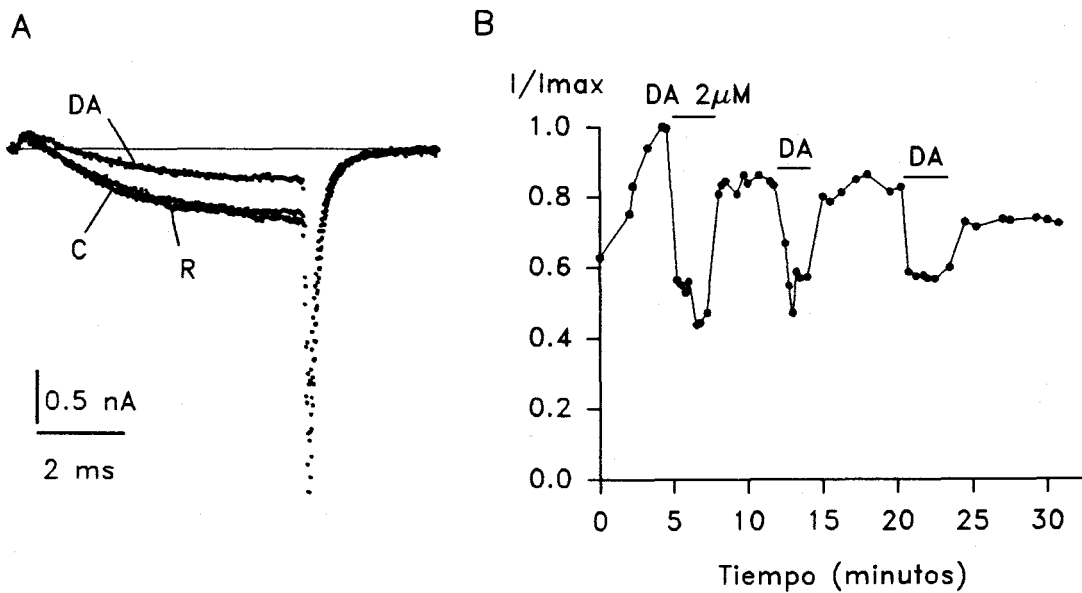


Figura 38. Efecto de dopamina al aplicarse repetidamente. A, registros de I_{Ba} obtenidos antes (C), durante (DA) y tras la recuperación (R) de la primera exposición a DA $2 \mu\text{M}$. B, curso temporal completo del efecto de DA aplicada en tres ocasiones sobre la misma célula. Nótese que el efecto es cada vez menor. Soluciones, 10Ba//110Cs, 20F, EGTA, ATP.

la corriente. Este hecho se ilustra en la figura 39 con trazados de I_{Ba} obtenidos en solución control (C) y durante la aplicación de DA (1 nM). El efecto inhibitorio máximo (DA en la figura) apareció a los 56 segundos de iniciar la perfusión con dopamina, y durante la misma la corriente aumentó progresivamente en amplitud (S_1 está tomado a los 76 segundos del cambio), llegando casi a alcanzar el valor inicial a los 120 s de difundir la dopamina en la solución (S_2). Este fenómeno es similar al de "desensitization" ("desensibilización" en español) descrito por primera vez en 1957 por Katz y Thesleff en el receptor nicotínico para acetilcolina y que de una forma u otra se observa en casi todos los canales iónicos regulados por ligandos. La desensibilización apareció en todos los experimentos en los que llevó a cabo una aplicación mantenida de dopamina (véanse Figs. 34, 37, 40 y 42), y aunque el

RESULTADOS

fenómeno es más acusado con bajas concentraciones de DA, también ocurre en el rango micromolar (véanse las Figs. 34B y 38B).

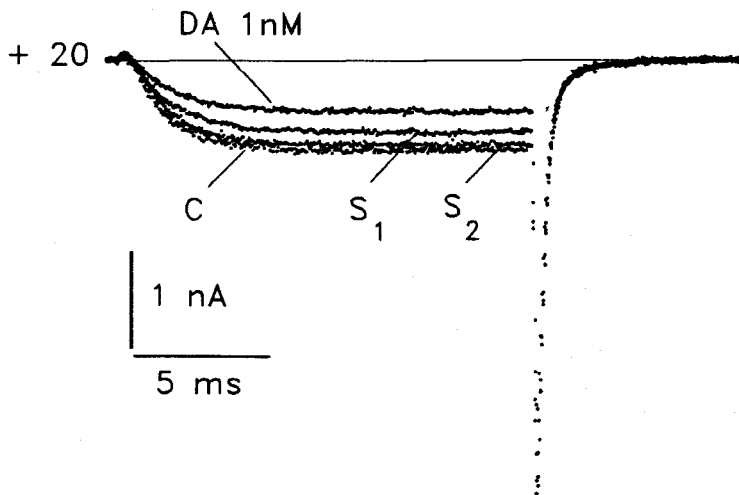


Figura 39. Desensibilización del efecto de DA sobre la corriente de Ba^{2+} . Los trazados superpuestos se obtuvieron con un pulso de 15 ms a +20 mV. C es el registro control y DA es el efecto máximo conseguido a los 56 segundos de perfundir 1 nM dopamina. Durante la aplicación de la misma se observó una recuperación de la amplitud de la corriente, S_1 y S_2 a los 76 y 120 s de perfusión. Soluciones 10Ba//110Cs, 20F, EGTA, ATP.

El estudio de la desensibilización de los canales regulados por ligandos o de la asociación de un ligando a un receptor requiere la exposición brusca de la preparación a concentraciones conocidas de agonista (lo que sería equivalente a un "concentration clamp"). Nuestro dispositivo experimental impide cambios "instantáneos" en la solución externa (ver "MATERIAL Y METODOS") y por lo tanto cuando la solución externa se cambió a una con dopamina, las células se expusieron en todos los casos a concentraciones progresivamente crecientes antes de

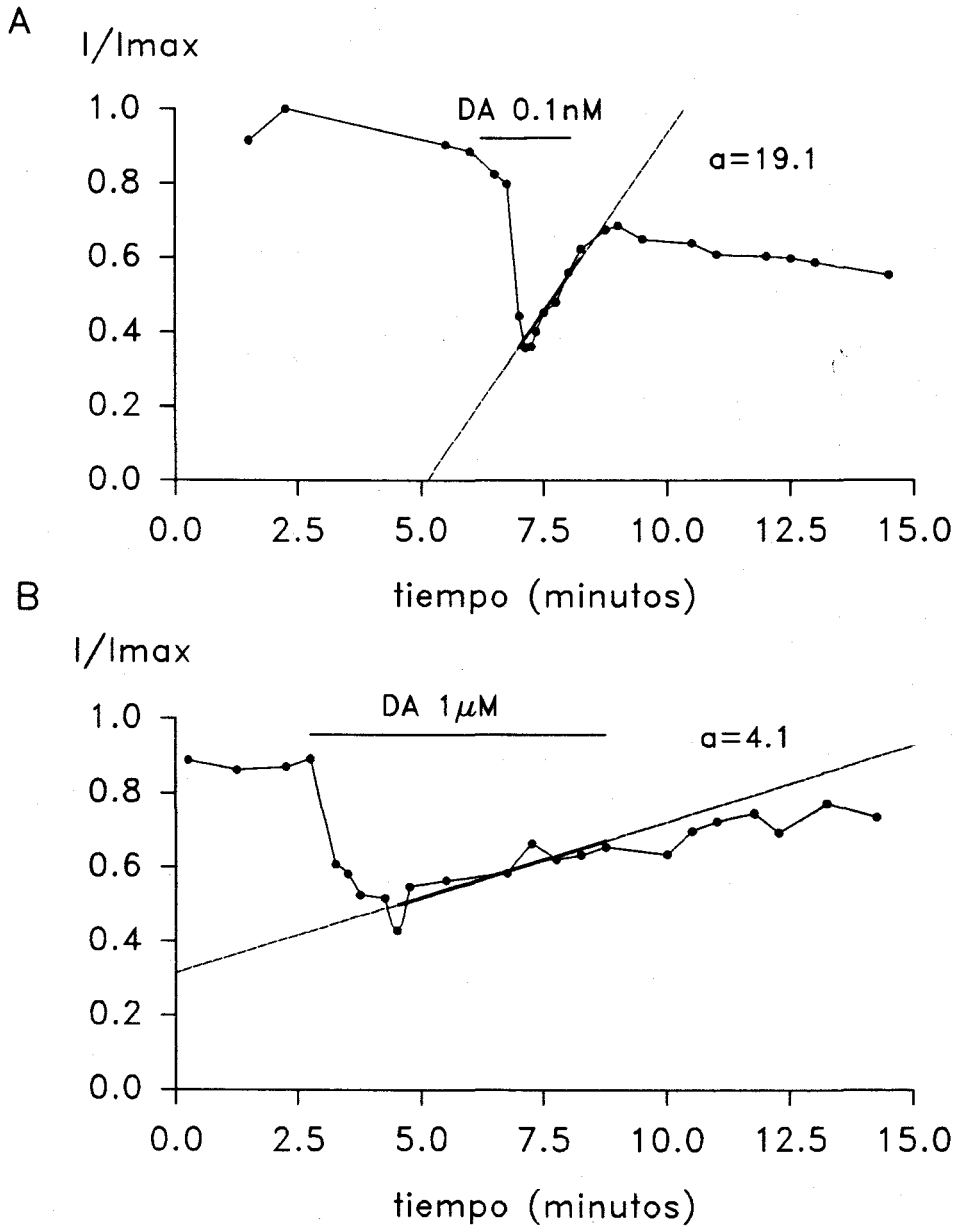


Figura 40. Desensibilización del efecto de dopamina sobre I_{Ba} . Durante la aplicación de DA se ha ajustado los valores de la amplitud de la corriente a una recta ($y = ax + b$) y se ha obtenido el valor de la pendiente (a). En A se muestra el ajuste de los datos obtenidos con 0.1 nM DA. La línea discontinua es una extrapolación a los ejes. La pendiente en este caso es $a = 19.1$ %/min (% de I_{Ba} que aumenta referido al tiempo de registro). B, idéntica situación con DA en el rango μ M; la pendiente en este caso es más lenta ($a = 4.1$). La amplitud de I_{Ba} está medida al final del pulso.

que la solución de la cámara de registro se recambiase completamente. A pesar de estas limitaciones se ha realizado un intento de "valoración cuantitativa" del proceso de desensibilización al objeto de poder analizar con algún detalle las observaciones experimentales. El método utilizado se ilustra en la figura 40 y consistió en ajustar una ecuación lineal a los puntos experimentales obtenidos durante la exposición a dopamina una vez que se alcanzó el valor máximo. La pendiente (a) de esta ecuación indica el porcentaje de recuperación de la corriente con el tiempo y asumimos que depende de la "velocidad aparente" con la que el complejo agonista-receptor se desensibiliza. En la figura 40 se presentan dos gráficas donde se observa este fenómeno a diferentes concentraciones de dopamina y donde, en cada caso, se ha ajustado linealmente el curso temporal de la desensibilización. Es evidente que la pendiente de cada línea (y por lo tanto la desensibilización aparente) es más acusada con dosis bajas de dopamina. Este mismo tipo de análisis se realizó en 19 células expuestas por vez primera a diferentes concentraciones de dopamina y un resumen se muestra en la tabla VII.

Tabla VII. Desensibilización de I_{Ba} en función de la concentración de DA.

[DA]	pendiente (%/t)	(n)
10 μ M	3.7 \pm 3.9	(4)
1 μ M	14.8 \pm 4.9	(6)
1-10 nM	21.2 \pm 6.4	(4)
0.1 nM	23.3 \pm 5.2	(5)

Los valores se indican como media \pm DE.

RESULTADOS

La dopamina parece interactuar de forma compleja con sus receptores en las células glómicas, pudiéndose resumir las siguientes observaciones experimentales:

- a) La inhibición "aparente" de la corriente de Ca^{2+} por dopamina decrece conforme se aumenta la concentración. Sorprendentemente, la dopamina en el rango pM tiene un efecto muy superior al que se observa con concentraciones mucho más elevadas.
 - b) Durante una exposición mantenida el efecto inhibitorio revierte casi completamente, lo que podría explicarse por desensibilización del complejo dopamina-receptor.
 - c) El curso temporal de la "desensibilización aparente" es más lento conforme mayor es la concentración de dopamina.
 - d) A una determinada concentración de dopamina, exposiciones repetidas producen disminución de la respuesta y un enlentecimiento de la "desensibilización aparente".
- Estas observaciones podrían explicarse en base al modelo de interacción dopamina-receptor que se resume en el apartado siguiente.

5. La inhibición de la corriente de Ca^{2+} por dopamina se ajusta a un modelo de receptor con tres estados funcionales.

Aunque las evidencias experimentales sugieren claramente que el efecto modulador de la dopamina sobre la corriente de Ca^{2+} sufre "inactivación" o "desensibilización", los mecanismos moleculares subyacentes no se conocen bien y por lo tanto es difícil establecer un modelo cinético. La modulación por dopamina de los canales de Ca^{2+} no representa un típico ejemplo de interacción ligando-canal, ya que el efecto modulador posiblemente se ejerce a través de mediadores (directamente por una proteína G_i o mediante la regulación de la síntesis de AMP_c ; véase más adelante). Por lo tanto, no es posible determinar en cuál de las interacciones moleculares ocurre el proceso de desensibilización: interacción dopamina-receptor, receptor-mediador o mediador-canal de Ca^{2+} .

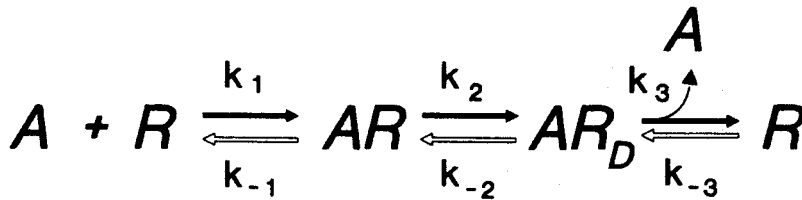
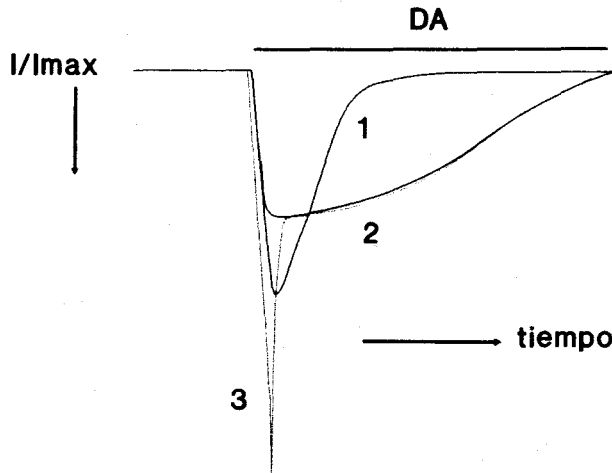


Figura 41. Modelo de interacción ligando-receptor. El ligando (A), en nuestro caso dopamina, se une a un receptor específico (R) formándose el complejo ligando-receptor (AR) y ejerciéndose el efecto (la reducción de la corriente). El complejo AR pasa a un estado inactivo o desensibilizado (AR_D) que no actúa sobre los canales de Ca²⁺. Al retirar el agonista el complejo inactivo se disocia en sus componentes (A y R). La transición entre los diferentes estados es posible en las dos direcciones y depende de las constantes cinéticas K₁, K₂, K₃ y K₋₁, K₋₂, K₋₃. En la parte superior de la figura se observa un gráfico trazado manualmente que simula las diferentes fases del modelo. 1 es el efecto de DA a bajas concentraciones (del orden nM), cuya pendiente de desensibilización es rápida. 2 es el efecto observado por concentraciones mayores (rango μM), con una pendiente más lenta y una disminución menor de I_B, que la obtenida con dosis bajas. 3 es una situación hipotética que se deduce del modelo propuesto, donde el efecto a dosis altas -saturantes- es pronunciado pero muy corto, ya que la desensibilización es muy rápida, razón por la cual no se observa con nuestro diseño experimental. El enlentecimiento posterior (pendiente lenta) de la desensibilización sí se registra y se debe a un estado de transición dinámica entre AR y AR_D en las dos direcciones posibles.

Teniendo presente las limitaciones indicadas anteriormente, la mayoría de las observaciones experimentales pueden explicarse cualitativamente basándose en un modelo sencillo de interacción ligando-receptor similar al que se ilustra en la figura 41. Se asume que el ligando (A) actúa con un receptor (R) y que la interacción

RESULTADOS

ligando-receptor pasa por varios estados funcionales; uno (AR), en el que se permite la acción reguladora de la dopamina sobre I_{Ca} , y otro (AR_D), en el que a pesar de mantenerse el enlace químico el sistema se desensibiliza y por lo tanto deja de actuar sobre los canales de Ca^{2+} . El complejo AR_D se disocia en sus componentes (A y R) al retirar el neurotransmisor, aunque en nuestras condiciones experimentales este paso está dificultado ya que una vez equilibrada en la solución externa la concentración de dopamina se mantuvo constante. La transición entre estados depende de constantes de velocidad en las dos direcciones posibles (K_1 , K_2 , K_3 y K_{-1} , K_{-2} , K_{-3}) y de las concentraciones de ligando y receptor. Aunque los valores de las constantes dependen fundamentalmente de las características estructurales del ligando y el receptor, se asume por conveniencia que éstas constantes podrían variar con concentraciones muy distintas de dopamina. La transición entre los diferentes estados son reacciones de primer orden y, por ejemplo, al añadir dopamina la velocidad de asociación al receptor viene dada por la "desaparición" de A según:

$$\frac{dA}{dt} = -k_1[A] \quad (6)$$

En la parte superior de la figura 41 se representan mediante líneas el curso temporal idealizado de los cambios en la amplitud de la corriente de Ca^{2+} en presencia de diferentes concentraciones de dopamina. Cuando la dopamina está presente en la solución externa a concentraciones relativamente bajas (línea 1) se forma el complejo AR, que tiene una vida media corta debido al alto valor de K_2 , y que espontáneamente se transforma en AR_D . Dado que A está permanentemente presente el sentido de las reacciones es hacia la derecha aunque K_{-1} y K_{-2} sean diferentes de cero. En estas condiciones tras alcanzarse el máximo de atenuación de la corriente se produce espontáneamente una disminución paulatina del efecto de dopamina hasta que todos los receptores activados pasan al estado AR_D . Al quitar

RESULTADOS

la dopamina del baño el equilibrio de la reacción cambia rápidamente y los receptores pierden las moléculas de dopamina, bien pasando directamente desde AR_D a A y R o desplazándose el sentido de la reacción hacia la izquierda. La línea 2 de la figura 41 muestra el curso temporal idealizado del efecto de concentraciones elevadas de dopamina. La atenuación "aparente" de la corriente de Ca^{2+} es menor y el curso temporal "aparente" de la desensibilización más lento. Estos fenómenos podrían explicarse por el modelo cinético propuesto ya que en este caso la velocidad de formación de AR (proporcional a $[A]$) es muy rápida así como la transición $AR \rightarrow AR_D$. Ya que nuestro protocolo experimental consiste en la aplicación de un pulso de potencial cada 5-10 s, es posible que en estas condiciones experimentales los primeros registros de corriente tras aplicar dopamina se obtengan cuando gran número de receptores se han desensibilizado y por esa razón el efecto de la dopamina se valore en una fase avanzada de la secuencia activación \rightarrow desensibilización. El curso temporal lento de la desensibilización tras esta fase inicial podría deberse bien a que existen varios estados del tipo AR_D o a que si la $[AR_D]$ se eleva bruscamente hay recirculación al estado AR. Como se indica mediante la línea de puntos en la figura 41 dosis elevadas de dopamina posiblemente producen una inhibición rápida de la corriente de Ca^{2+} con una primera fase de desensibilización también muy rápida ("filtrada" por nuestro protocolo y condiciones experimentales) que da lugar a que el efecto "aparente" sea menor, seguida de una fase de desensibilización más pequeña y más lenta que es la que se observa experimentalmente. El paso del complejo desensibilizado a la conformación de receptor en reposo capaz de ser activado debe ser lento (del orden de varios minutos) pues la aplicación repetida de dopamina aumenta progresivamente el número de receptores inactivos, acumulándose la desensibilización y obteniéndose un menor efecto inhibitorio.

En algunas células a las que se les aplicó DA a concentraciones nM se observó que tras una disminución inicial de la corriente siguió una fase de

RESULTADOS

desensibilización muy acusada llegando a registrarse amplitudes de corriente durante la aplicación de DA superiores a las iniciales en la situación control. Al retirar el transmisor de la solución externa se registró una rápida disminución de la corriente que volvió lentamente a su valor inicial antes de aplicar la DA. En la figura 42 se muestra un ejemplo de este fenómeno obtenido con 1 nM dopamina, que se repitió (aunque con menor intensidad) al repetir la aplicación del neurotransmisor. El modelo propuesto explica también este comportamiento de la dopamina, ya que si el receptor está en su mayoría en forma de complejo AR_p (la desensibilización es muy acusada), al retirar el agonista la reacción tenderá a desplazarse a la izquierda pasando por la forma activa del complejo (AR), reduciéndose por tanto la corriente de Ca^{2+} . La desaparición total del agonista lleva al receptor a su estado inicial R lo que restablece la amplitud original de la corriente.

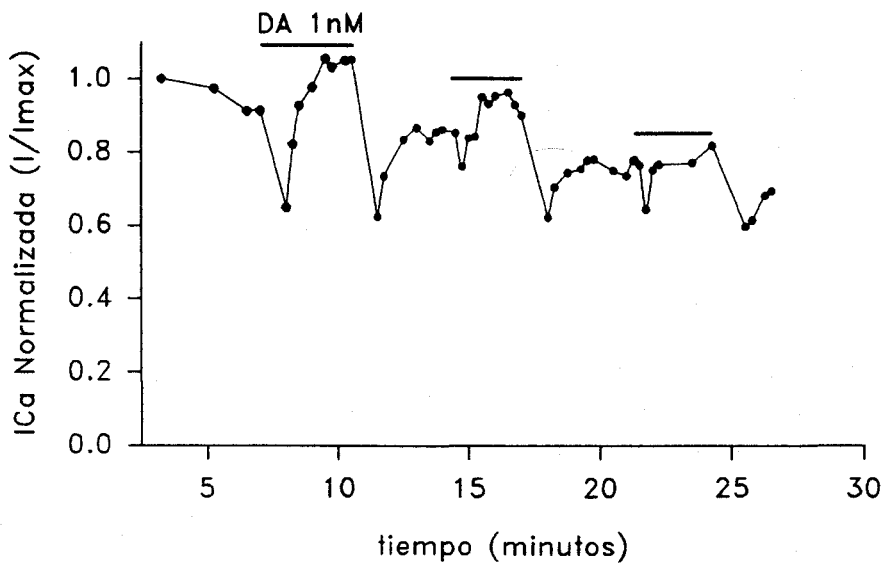


Figura 42. Aumento de la amplitud de la corriente de Ba^{2+} durante la aplicación de DA. Tras la disminución rápida de la I_{Ba} , se observa un incremento de la amplitud de la corriente que supera incluso el valor inicial. El fenómeno se repite las tres veces que se aplica la DA.

RESULTADOS

El modelo discutido en los párrafos anteriores es parecido al propuesto para el receptor nicotínico de ACh y, al igual que éste, el estado desensibilizado podría estar formado por estados intermedios con fases de desensibilización rápida y lenta (Feltz y Trautmann, 1982; Sakmann et al., 1980; Hille, 1984) que explicarían la interacción compleja de la dopamina con su receptor y los efectos resultantes sobre la corriente de Ca^{2+} .

6. La dopamina posiblemente ejerce su acción a través de un receptor de alta afinidad unido a una proteína G.

En células ganglionares sensoriales de vertebrados se ha demostrado que la inhibición de los canales de Ca^{2+} por neurotransmisores está mediada por una proteína G (Holz et al, 1986), al igual que ocurre con dopamina en neuronas de invertebrados (Harris-Warrick et al, 1988). En el presente trabajo se sugiere que las células glómicas poseen un mecanismo similar y que el efecto modulador de la dopamina sobre la corriente de Ca^{2+} se debe a la activación de una proteína G del tipo inhibitoria (G_i). Para contrastar esta hipótesis se diseñaron dos tipos de experimentos que se muestran en este apartado, obtenidos utilizando análogos no hidrolizables de GTP, que estimulan de forma permanente la proteína G, y toxina pertussis (PTX), una toxina bacteriana que produce la ADP-ribosilación de la subunidad α de la proteína G inhibitoria impidiendo la unión del GTP, lo que inactiva permanentemente la proteína G_i (Birnbaumer et al., 1987; Gilman, 1987; Dolphin, 1987).

El $\text{GTP}\gamma\text{S}$ es un análogo del GTP que una vez unido a la subunidad α de la proteína G no se hidroliza y la mantiene continuamente activada. En la figura 43 se muestra el efecto que produce $400\mu\text{M}$ $\text{GTP}\gamma\text{S}$ aplicado intracelularmente al exponer la célula a dopamina $1\mu\text{M}$ en presencia de 2 mM Mg^{2+} intracelular. Una vez disminuye la corriente de Ca^{2+} al retirar la dopamina se obtuvo una recuperación de

RESULTADOS

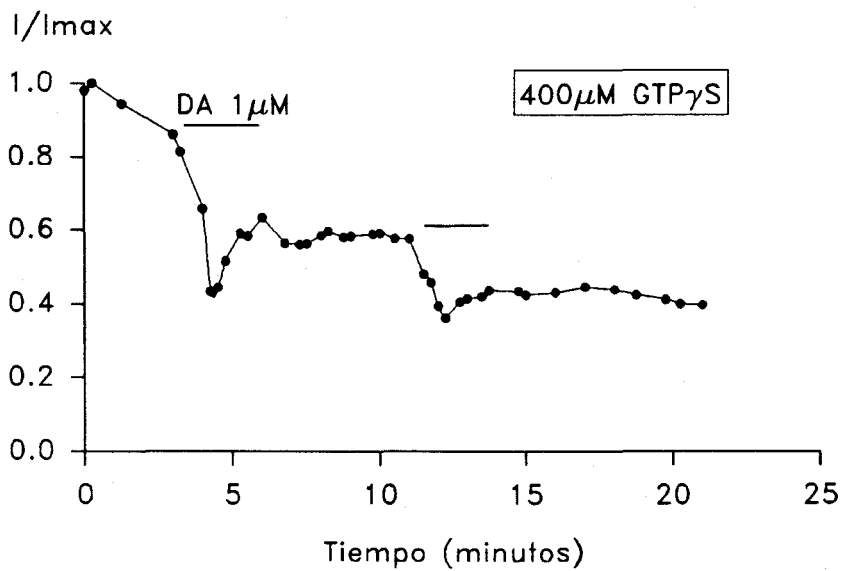


Figura 43. Efecto de DA sobre la I_{Ba} en presencia de $400 \mu\text{M}$ de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ en la solución interna. Tras la primera aplicación de DA la recuperación de la corriente es pequeña, y en la segunda exposición el efecto de DA fue irreversible.

sólo el 40 %, y una segunda exposición produce un efecto que aunque menor es irreversible. Esta observación sugiere que la activación permanente de la proteína G por el $\text{GTP}\gamma\text{S}$ impide la recuperación de la corriente.

Un determinado número de células se incubaron durante 12 horas en presencia de toxina pertussis (200 ng/ml) con objeto de conseguir la inactivación permanente de la (o las) proteínas G que pudieran ser responsables del efecto de la dopamina sobre la corriente de Ca^{2+} . Tanto las células controles como las preincubadas con PTX mostraron ser sensibles a la acción de DA, que inhibió de forma reversible la I_{Ca} en los dos grupos de células sin que se observasen diferencias significativas entre ellas. Puesto que la PTX no evitó el efecto de DA, no puede concluirse definitivamente que la inhibición de la I_{Ca} está mediada por una proteína G_i , pero tampoco se excluye esta posibilidad, ya que el efecto obtenido con $\text{GTP}\gamma\text{S}$

RESULTADOS

es una evidencia a favor de la acción de la proteína G. La falta de efecto de la PTX podría deberse a que el tiempo de incubación de las células con la toxina o la concentración utilizada de ésta no fuera suficiente para ADP-ribosilar la subunidad α de la proteína, o que la toxina utilizada (Sigma Chemicals) no tuviera la actividad deseada. Otra posibilidad es que el sitio de ADP-ribosilación en la subunidad α de la proteína no sea accesible a la toxina por encontrarse en un "pool" oculto o por difusión deficiente de la PTX al interior celular.

Debido a que las soluciones internas contenían 20 mM FCs en determinados experimentos donde se estudió el efecto de dopamina, y puesto que se ha descrito que el fluoruro unido a aluminio puede activar la proteína G (Gilman, 1987), se realizaron experimentos donde se comparó el efecto inhibitorio de DA sobre la I_{Ca} utilizando soluciones internas con 10 mM EGTA, con flúor (110 mM CsCl + 20 mM CsF) y sin él (130 mM CsCl; véase *soluciones de registro* en "MATERIAL Y METODOS"). En ambos casos la DA redujo la corriente de Ca^{2+} de forma reversible en aplicaciones repetidas, y a igualdad de concentración de DA, el porcentaje de inhibición de I_{Ca} fue similar. Por lo tanto, la presencia de flúor en la solución interna no influye en el efecto modulador que ejerce la dopamina sobre I_{Ca} ni en la regulación metabólica de la corriente (véase el apartado D de "RESULTADOS").

En resumen, la corriente de Ca^{2+} está modulada de forma selectiva por dopamina, que produce una inhibición reversible de dicha corriente en concentraciones subnanomolares, indicando la presencia de un receptor específico de alta afinidad, cuyo comportamiento se puede ajustar a un modelo con al menos tres estados funcionales diferentes y que presenta la propiedad de desensibilizarse o inactivarse ante la exposición prolongada a dopamina. Los resultados coinciden con el efecto que produce el receptor D_2 en otras preparaciones (Seeman, 1986), aunque recientemente se han descrito hasta 5 tipos diferentes de receptores para dopamina

RESULTADOS

(Van Tol et al., 1991; Sunahara et al., 1991), lo que obliga a reconsiderar este punto (véase "DISCUSION"). El efecto de la dopamina parece estar mediado por una proteína G inhibitoria pues es irreversible con GTP γ S. La inhibición de los canales de Ca²⁺ por dopamina es un mecanismo de retrocontrol negativo de la secreción de gran sensibilidad. Puesto que el calcio es necesario para la secreción, su significado fisiológico tiene suma importancia, ya que limita la cantidad de neurotransmisor liberado y previene la degranulación excesiva y el daño celular en situaciones de estimulación intensa.

7. La noradrenalina tiene un efecto similar al de la dopamina sobre la corriente de Ca²⁺, aunque con menor potencia.

Como se ha indicado previamente, las células glómicas contienen noradrenalina (NA), aunque en menor proporción que dopamina (entre 5 y 10 veces menos; Fidone y González, 1986). En el presente trabajo se estudió su efecto sobre las conductancias iónicas siguiendo un protocolo similar al empleado con la DA.

En la figura 44 se resumen los resultados obtenidos al aplicar en la solución externa 1 μ M noradrenalina ([-] arterenol bitartrato). El efecto inhibitorio de NA sobre la I_{Ca} es bastante menor que el conseguido con la misma concentración de dopamina, y la recuperación de la corriente a los niveles iniciales se consigue sólo parcialmente (fig.44A y B). los trazados en C y D muestran un efecto inhibitor moderado que en el mejor de los casos no llega al 20% de reducción de la I_{Ca} en la primera exposición (Fig. 44B). La misma concentración de noradrenalina en su forma (\pm) no produjo ninguna modificación de la corriente de Ca²⁺, por lo que el efecto parece selectivo del estereoisómero (-). Al igual que se hizo con dopamina, la noradrenalina se preparó justo antes de aplicarse a la solución de registro con el fin de evitar en lo posible su oxidación, pues no se emplearon antioxidantes por las razones expuestas en "MATERIAL Y METODOS". El mecanismo de acción parece

RESULTADOS

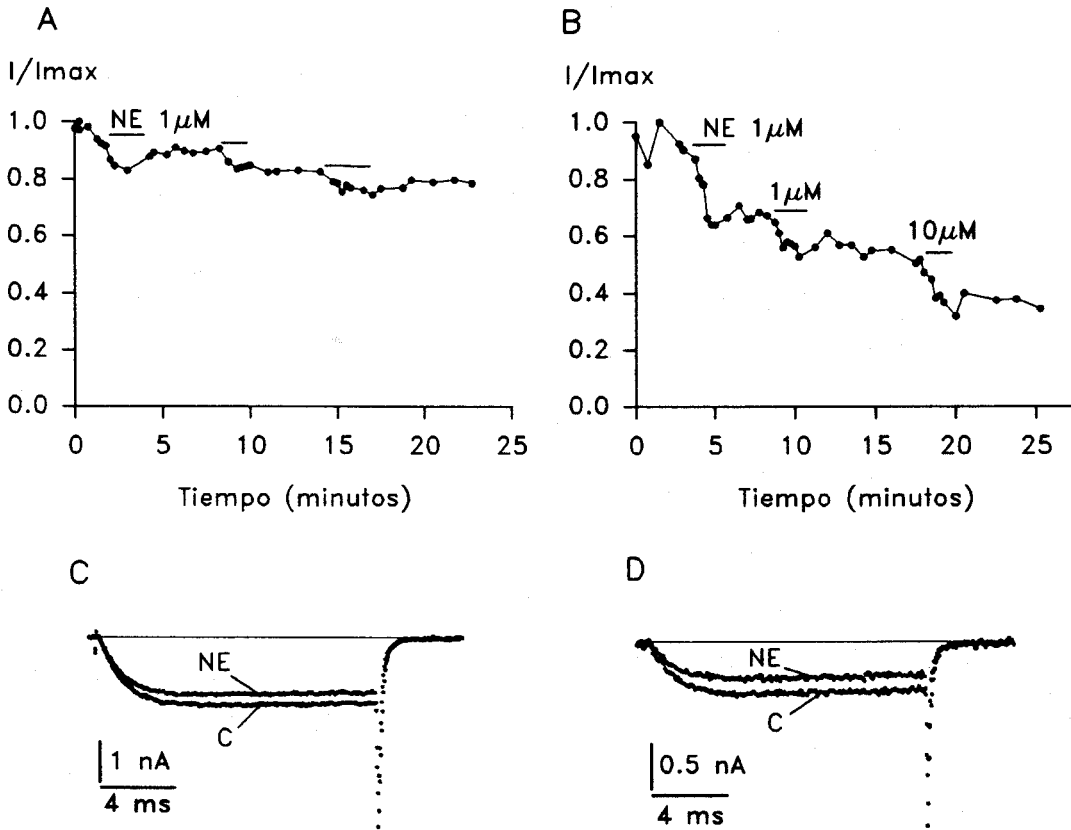


Figura 44. Efecto de la aplicación de noradrenalina (NA) sobre la corriente de Ca^{2+} . A y B, disminución de I_{Ca} al exponer la célula en tres ocasiones a NA $1 \mu M$. El efecto es mucho menos apreciable comparado con el que se obtiene con la misma concentración de DA, y al igual que ésta, es recuperable. B y C, registros tomados de las gráficas A y B respectivamente, superpuestos para comparar el efecto de NA. Soluciones, $10Ca//130Cs$, EGTA, ATP.

similar al de la dopamina, pues no se modifican las características cinéticas ni otros parámetros voltaje-dependientes. Sin embargo el papel que juega la noradrenalina en la regulación de la corriente de Ca^{2+} de las células glómicas queda por determinar, aunque su similitud de efecto (aunque en menor proporción) al ejercido por DA podría sugerir que, al igual que ésta, participa en la autoregulación de la secreción.

DISCUSION

En el presente trabajo se ha caracterizado la corriente de Ca^{2+} de las células tipo I del cuerpo catorídeo analizando sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Se ha investigado la modulación de los canales de Ca^{2+} por dopamina (y noradrenalina) que son productos que se almacenan en gránulos en el citosol de las células tipo I y que podrían estar involucrados en mecanismos de autorregulación de la secreción. Las observaciones más importantes son las siguientes:

a) Las células glómicas poseen una población homogénea de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes de alto umbral.

b) Los canales de Ca^{2+} están sujetos a una importante regulación metabólica y su estabilidad funcional parece depender del equilibrio entre fosforilación y desfosforilación. Los canales de Ca^{2+} son por lo tanto substrato de quinasas y fosfatasas intracelulares.

c) La dopamina, y con menor potencia la noradrenalina, inhibe de forma selectiva y reversible la corriente de Ca^{2+} . La acción de la dopamina podría estar mediada por un receptor de alta afinidad acoplado a una proteína G. Se propone un modelo simplificado que explica algunos efectos aparentemente "paradójicos" del neurotransmisor.

d) La modulación de la corriente de Ca^{2+} por catecolaminas representa un fenómeno de inhibición presináptica del que existen muy pocos modelos fácilmente

abordables con las técnicas disponibles. Este mecanismo de autorregulación de la secreción puede tener un significado funcional importante al limitar la exocitosis de las células glómicas en respuesta a los estímulos fisiológicos y podría estar implicado en los procesos adaptativos que ocurren en el cuerpo carotídeo en condiciones especiales.

A) CORRIENTE DE CALCIO DE CELULAS GLOMICAS.

La corriente de calcio de las células glómicas depende de la actividad de canales de Ca^{2+} cuyas propiedades biofísicas generales resumidas son: umbral de activación alto, inactivación lenta, cinética de cierre muy rápida, permeabilidad a $\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ y bloqueo por metales de transición y otros cationes divalentes aplicados extracelularmente. Las propiedades cinéticas de estos canales son similares a las descritas en otras células secretoras como GH_3 (Hagiwara y Ohmori, 1982; Matteson y Armstrong, 1986), pars intermedia de la hipófisis (Cota, 1986), células cromafines (Fenwick et al., 1982), adrenocorticales (Tabares et al., 1989) y en neuronas (Fox et al., 1987; Castellano y López-Barneo, 1991). Por su umbral de activación y su cinética de deactivación la corriente de Ca^{2+} de las células glómicas se puede clasificar como de alto umbral de activación (Carbone y Lux, 1984) o FD ("fast deactivating") (Armstrong y Matteson, 1985), también llamada tipo L (Fox et al., 1987). Las propiedades farmacológicas de la corriente de Ca^{2+} de las células tipo I son también semejantes a las descritas para canales tipo L en otras preparaciones, puesto que se bloquea por cationes divalentes con una potencia relativa similar ($\text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \approx \text{Co}^{2+}$) y por dihidropiridinas como nifedipina y elgodipina (ver Tsien, 1988).

El análisis de las características cinéticas muestra que la inactivación de la corriente de Ca^{2+} es lenta y poco dependiente de potencial (V_M). Por el contrario, parece estar relacionada con el paso de iones Ca^{2+} a través de los canales, ya que

DISCUSION

este fenómeno desaparece al sustituir el Ca^{2+} extracelular por Ba^{2+} y es más acusado a potenciales en los que la entrada de calcio al citosol es máxima (véanse Figs. 14 y 15). La corriente de Ca^{2+} de alto umbral descrita en otras preparaciones se inactiva también lentamente, pero no hay acuerdo general sobre los factores que desencadenan este proceso y se discute su dependencia del voltaje y/o de Ca^{2+} (Fox, 1981; Sánchez y Stefani, 1983; Armstrong y Matteson, 1985; Carbone et al., 1988). En una publicación muy reciente, Mazzanti et al. (1991) proponen un modelo en el que la inactivación es dependiente de Ca^{2+} extracelular y puede deberse a la transición de un estado de canal activado al de bloqueo que sería proporcional al número de iones de Ca^{2+} que difunden el canal. El modelo asume que el paso de los iones a través del canal es capaz de producir el bloqueo de otros canales adyacentes, lo que explica la rápida inactivación que se observa cuando la densidad de canales de alto umbral es elevada.

La cinética de cierre de la corriente de Ca^{2+} medida en un total de 99 células es rápida ($\tau = 162.6 \mu\text{s}$ con Ca^{2+} como transportador de carga) y su valor coincide con los descritos en otras células (Cota, 1986; Swandulla y Armstrong, 1988; Tabares et al., 1989; Castellano y López-Barneo, 1991). En la mayoría de las células analizadas el curso temporal de la corriente de cierre se pudo ajustar a una función exponencial con una única constante de tiempo, lo que indica que la población de canales de calcio en las células glómicas es homogénea. Sin embargo, en algunas células, se observó un componente lento de "tail current" una vez que la mayor parte de la corriente de Ca^{2+} había desaparecido como consecuencia del lavado (véase Fig. 25 y su explicación en "RESULTADOS").

El fenómeno descrito en el párrafo anterior puede deberse a la existencia de un tipo diferente de canal de Ca^{2+} al ya descrito (sería en este caso un canal de dectivación lenta o SD), cuya contribución al componente total de corriente de Ca^{2+} es pequeña y que no sufre el fenómeno del lavado. Una evidencia a favor de la

DISCUSION

existencia de un canal de deactivación lenta es que conforme avanza el proceso de lavado, la conductancia relativa de la corriente aumenta a potenciales entre -40 y 0 mV (Fig. 27). Sin embargo, este cambio en la curva $G_{Ca}-V_M$ no se observó en todas la células estudiadas, sino que por el contrario sólo un pequeño porcentaje presentaron estas características (compárese por ejemplo la curva $G_{Ca}-V_M$ de las Figs. 27 y 32). En contra de la existencia de canales de deactivación lenta está la forma de la curva corriente-voltaje de la mayoría de las células, donde no se apreció en ningún caso un aumento de la amplitud de la corriente a voltajes en los que estos canales están activados (Castellano y López-Barneo, 1991). Igualmente, aplicando prepulsos despolarizantes de hasta 1000 ms (manteniendo el V_M entre -40 y -10 mV) no se observó ningún cambio en la "tail current" en un pulso de 7 ms a +40 mV, lo que sugiere la no existencia de canales lentos, ya que éstos se inactivarían rápidamente y producirían un cambio en la cinética de la corriente de cierre. Probablemente la mayoría de las células glómicas poseen un sólo tipo de canales de Ca^{2+} , de alto umbral, aunque queda por determinar si existe otro tipo de canal, de deactivación lenta, que -de existir- contribuye escasamente a la corriente iónica total debida a Ca^{2+} . Dado que la densidad de canales de Na^+ en células tipo I es muy variable (López-López et al., 1989) es probable que los posibles canales de Ca^{2+} SD sólo estén presentes en células con muy pocos canales de Na^+ . Aunque la existencia o no de un segundo tipo electrofisiológico de canal de Ca^{2+} creemos es de poca trascendencia funcional (ya que su densidad sería en todo caso pequeña) esta pregunta podría responderse de forma definitiva mediante el registro de corriente unitaria en microáreas de membrana.

El registro de la corriente de Ca^{2+} cuando el transportador de carga es Ba^{2+} muestra diferencias importantes si se compara con los datos obtenidos con Ca^{2+} como ion permeabilizante. Con Ba^{2+} en la solución externa la amplitud de la corriente es mayor, normalmente en una relación 2:1 (ver Fig. 16). Otras diferencias se encuentran en la cinética de cierre y en la inactivación; el curso temporal de la

DISCUSION

corriente de cierre es más lento en presencia de Ba^{2+} que de Ca^{2+} (compárese el valor de τ en la pág. 58 y en la Fig. 18), y la inactivación que se observa en pulsos de voltaje entre -20 y 0 mV con 10 mM Ca^{2+} en la solución externa desaparece al sustituir el catión por Ba^{2+} (Fig. 14). Otras modificaciones inducidas por Ba^{2+} se relacionan con los parámetros voltaje-dependientes de la corriente, como la curva I-V, que se desplaza 15-20 mV a la izquierda (Fig. 18), y la relación conductancia-voltaje, donde la activación de la corriente se produce a unos 15 mV más negativos con Ba^{2+} que con Ca^{2+} (Fig. 11). Estos datos son semejantes a los descritos en otras preparaciones (Cota, 1986; Fox et al., 1987; Tsien, 1988; Swandulla y Armstrong, 1988; Castellano y López-Barneo, 1991) y confirman la clasificación de la I_{Ca} de las células glómicas como de alto umbral, FD o tipo L. El mecanismo por el que el Ba^{2+} modifica la cinética de los canales de Ca^{2+} se desconoce, sin embargo representa un ejemplo de un hecho cada vez mejor comprobado que se refiere a que los iones permeabilizantes (y en ocasiones bloqueantes) pueden modificar las características cinéticas de los canales por donde difunden (Armstrong y López-Barneo, 1987).

Si la presencia de Ba^{2+} en la solución externa produce un aumento en la amplitud de la corriente de Ca^{2+} , otros cationes divalentes como Cd^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} tienen un efecto opuesto y cuando se añaden al medio extracelular a concentraciones μM actúan como bloqueantes de la corriente. Este efecto se conoce desde hace tiempo (Hagiwara y Takahashi, 1967; Kohlhardt et al., 1972) y lo ejercen también otros metales pesados como Zn^{2+} y La^{3+} (Lansman et al., 1983). La potencia de bloqueo no es igual para todos los cationes polivalentes y en función de ella se pueden clasificar por orden de efectividad (Hagiwara y Takahashi, 1967). Además los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} no tienen la misma sensibilidad a los bloqueantes inorgánicos, propiedad por la que se distinguen los canales de Ca^{2+} (Fox et al., 1987; Tsien et al., 1988) tipo L, en los que el Cd^{2+} es un bloqueante más potente que el Ni^{2+} , mientras que en los tipo T ocurre lo contrario. En el cuerpo

DISCUSION

carotídeo, la secuencia de bloqueo de la I_{Ca} en cuanto a efectividad es $Cd^{2+} > Ni^{2+} \approx Co^{2+}$, lo que confirma que se trata de canales tipo L. El efecto bloqueante de Cd^{2+} y Ni^{2+} es reversible al retirar los cationes de la solución externa, a diferencia del Co^{2+} , que en nuestra preparación fue muy irreversible.

Las propiedades farmacológicas de los canales de Ca^{2+} tienen una gran importancia no sólo por emplearse como herramienta en la caracterización biofísica de las conductancias para calcio, sino además porque los fármacos que actúan sobre ellos tienen una importante aplicación en determinadas patologías cardiovasculares (Triggle, 1987). En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de dos dihidropiridinas, nifedipina y elgodipina, sobre las propiedades cinéticas de los canales de Ca^{2+} . La nifedipina produce un bloqueo de la corriente de Ca^{2+} a concentraciones μM al igual que se ha descrito en otras células (Fleckenstein, 1977; Hess et al., 1984; Klöckner e Iseberg, 1989). La reducción de la amplitud de la corriente por nifedipina es dependiente de voltaje, de manera que cuanto más se despolariza la célula, mayor es el bloqueo, lo que coincide con las observaciones de otros autores (Hess et al., 1984) utilizando nifedipina y otros bloqueantes orgánicos como verapamil y D600. Esta propiedad posiblemente se debe a que estos fármacos tienen mayor afinidad por el estado abierto del canal o a que sea necesario que el canal se abra para que estas moléculas puedan alcanzar el lugar específico de unión en el poro de conducción.

La cinética de activación de I_{Ca} en las células glómicas fue más rápida al aplicar nifedipina, volviendo a su valor normal al retirar el fármaco. Sin embargo, la cinética de cierre no se modificó por el bloqueante. Estas observaciones, junto con la dependencia de voltaje en el bloqueo por nifedipina pueden indicar que la reducción de I_{Ca} se debe a modificaciones en el comportamiento funcional del canal, aparte de reducir el número de canales operativos por los que permeabiliza el Ca^{2+} .

La nifedipina es liposoluble y su difusión en la interfase lípido-proteína del canal podría alterar sus características cinéticas.

La elgodipina es una molécula de reciente diseño derivada de la oxodipina y con unas propiedades características (véase "RESULTADOS", pág. 68). En este trabajo es la primera vez que se estudia su efecto directamente sobre los canales iónicos con la técnica de "patch-clamp". Su efecto, muy potente, es bloqueante a concentraciones nM (tres órdenes de magnitud por debajo de nifedipina), y a diferencia de ésta, no modifica las características cinéticas de la corriente de Ca^{2+} . El bloqueo ejercido por elgodipina no parece ser dependiente del potencial, y es parcialmente reversible cuando se retira del medio. A concentraciones superiores, del orden de 10^{-7} - 10^{-5} M, el efecto es más potente pero muy poco reversible (Fig. 24). La acción de elgodipina es selectiva sobre canales de Ca^{2+} , pues no modifica las características de la corriente de Na^+ ni de K^+ . Una propiedad llamativa de elgodipina es que a dosis en el rango 10^{-11} M se comporta como agonista de la corriente de Ca^{2+} (Fig. 24) de forma reversible. Esta actividad como "agonista parcial" puede encontrarse en otras dihidropiridinas como nifedipina (Boll y Lux, 1985), nitrendipina (Hess et al., 1984) o niguldipina (Klöckner e Isenberg, 1989), y algunas como BAY K 8644 ejercen como agonista en un amplio rango de concentraciones (Brown et al., 1984). Por su alta afinidad la elgodipina puede tener una aplicación potencial como herramienta en la caracterización electrofisiológica y purificación de canales de Ca^{2+} . Está por determinar su posible aplicación terapéutica.

B) REGULACION METABOLICA DE LA CORRIENTE DE Ca^{2+}

Es bien conocido que en diferentes preparaciones la corriente de Ca^{2+} registrada en el modo "whole-cell" tiende a desaparecer cuando el interior celular se dializa con la solución salina de la micropipeta de vidrio (Fedulova et al., 1981; Fenwick et al., 1982). La corriente de calcio de las células glómicas sufre este

DISCUSION

proceso de forma muy acusada (Fig. 25), pues a los 5 min del inicio del registro la amplitud de la corriente disminuye un 86 %, indicando que con la diálisis se pierden constituyentes moleculares del citosol que participan activamente en el mantenimiento funcional de los canales de Ca^{2+} . El lavado es un fenómeno que en las células tipo I se presenta solamente en la corriente de Ca^{2+} , pues no se observa en las de Na^+ ni de K^+ (Ureña et al., 1989b). La concentración intracelular de Ca^{2+} es un factor determinante en el lavado de la corriente, ya que el empleo de quelantes como EGTA o BAPTA en la solución interna retrasa la desaparición de I_{Ca} . La participación del Ca^{2+} extracelular no parece importante en el fenómeno del lavado, lo que sugiere que este proceso no está relacionado con la inactivación de la corriente durante el pulso donde sí interviene el Ca^{2+} externo. El lavado de la I_{Ca} puede retrasarse si a la solución interna se añade ATP a concentración 3-4 mM. El efecto es aditivo si además hay EGTA o BAPTA como quelantes del calcio intracelular, consiguiéndose mantener el 70 % de la amplitud de la corriente a los 10 min de registro, y el 60 % a los 20 min.

El lavado de la corriente no supone la alteración de las características cinéticas de los canales de Ca^{2+} (Figs. 27 y 32). Tanto la activación como la "tail current" no se modifican en el transcurso del registro, así como la relación corriente-voltaje (salvo la disminución de la amplitud) y la curva conductancia-voltaje. Estas evidencias sugieren que el lavado de la I_{Ca} es un proceso debido a la pérdida o disminución de una población funcionalmente activa de canales de calcio más que a cambios en sus propiedades biofísicas.

La importancia de la participación del ATP en la regulación metabólica de la corriente de Ca^{2+} viene reforzada por la acción aditiva de los nucleótidos cíclicos. El AMP_c aplicado intracelularmente mantiene estable la I_{Ca} durante un periodo prolongado (véanse Fig. 30A y Tabla IV) y superior al conseguido sólo con ATP y EGTA. Estos resultados indican que el canal de Ca^{2+} necesita ser fosforilado para

mantener su estado funcional, de la misma forma que se ha propuesto en otras preparaciones donde se ha observado el fenómeno del lavado (Chad y Eckert, 1986; Armstrong y Eckert, 1987). Algunas de las moléculas que intervienen en la regulación de este proceso deben estar en forma soluble en el citoplasma, ya que su pérdida durante la diálisis del citosol determina la desaparición de I_{Ca} , que puede restablecerse añadiendo a la solución interna un extracto de homogenado de tejido (Kameyama et al., 1988).

Si la proteína que forma el canal iónico es el sustrato de la fosforilación reversible, deben existir enzimas que catalicen esta reacción. Se conocen múltiples quinasas intracelulares capaces de fosforilar proteínas, y algunas de ellas participan en la regulación de canales iónicos como la proteína quinasa C (DeRiemer et al., 1985; Kaczmarek, 1988), la subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMP_C (PKA_{SC}) (Armstrong y Eckert, 1987, Gross et al., 1990) o la proteína quinasa dependiente de GMP_C (Nestler y Greengard, 1983). En el presente trabajo se demuestra que en células glómicas sujetas a diálisis la subunidad catalítica de la proteína quinasa A interviene en el control metabólico de la corriente de Ca^{2+} al añadirse a la solución interna de registro en presencia de ATP y EGTA. La interacción de estas moléculas reguladoras (ATP, AMP_C y PKA_{SC}) produce en último término la fosforilación de los canales de Ca^{2+} y con ello mantienen su estado funcional. Se había descrito que la PKA_{SC} puede evitar la desaparición de los canales de Ca^{2+} en microáreas de membrana escindidas (Armstrong y Eckert, 1987) pero no se conocía su acción en células sometidas a diálisis ni se había realizado un estudio comparativo de los diferentes agentes fosforilantes.

Aparte de los mecanismos fosforilantes se conocen otros agentes intracelulares con un efecto opuesto, como las fofafasas, cuya actividad determina la desfosforilación de proteínas citosólicas y de membrana. En este sentido se ha descrito que la calcineurina, una fosfatasa activada por calcio/calmodulina, puede

DISCUSION

limitar el flujo de iones Ca^{2+} al citoplasma desfosforilando los canales de Ca^{2+} o una proteína directamente relacionada con ellos, produciendo de esta manera la inactivación de la corriente de Ca^{2+} (Chad y Eckert, 1986; Armstrong, 1989). En las células tipo I del cuerpo carotídeo la trifluorperacina, un inhibidor de la calmodulina, retrasa el lavado en las condiciones experimentales de la figura 31, comparada con la situación control (véase tabla IV), lo que indica la existencia de fosfatasa intracelulares que regulan la actividad de los canales de Ca^{2+} de forma parecida a la descrita más arriba. Aunque se ha sugerido que en canales tipo L la inactivación y el lavado podrían ser efectos de un mismo fenómeno (la defosforilación activada por la entrada de Ca^{2+}) (Chad y Eckert, 1986; Armstrong, 1989), nuestros resultados sugieren que los mecanismos subyacentes a ambos procesos no son idénticos. Como se discutió anteriormente, la inactivación desaparece cuando se usa Ba^{2+} como transportador de carga mientras que en estas condiciones no se modifica apreciablemente el curso temporal del lavado de la corriente.

Aunque la adición de quinasas, nucleótidos exógenos y quelantes de Ca^{2+} estabiliza la amplitud de la I_{Ca} , el proceso del lavado no se pudo detener completamente y en las mejores condiciones siempre se produjo una disminución progresiva de I_{Ca} en el transcurso de los experimentos. Este fenómeno no puede explicarse por un simple "run down" de la preparación ya que en las mismas condiciones experimentales las corrientes de Na^+ y K^+ se pudieron registrar de forma estable. La desaparición no recuperable de parte de la I_{Ca} durante el lavado se ha descrito en otras preparaciones y puede deberse a la existencia de un proceso irreversible de lavado como el propuesto por Chad y Eckert (1986) en neuronas de moluscos. Estos autores sugieren que los canales de Ca^{2+} podrían ser destruidos por la acción de proteasas intracelulares, ya que este proceso se interrumpe por inhibidores de estas enzimas como leupeptina.

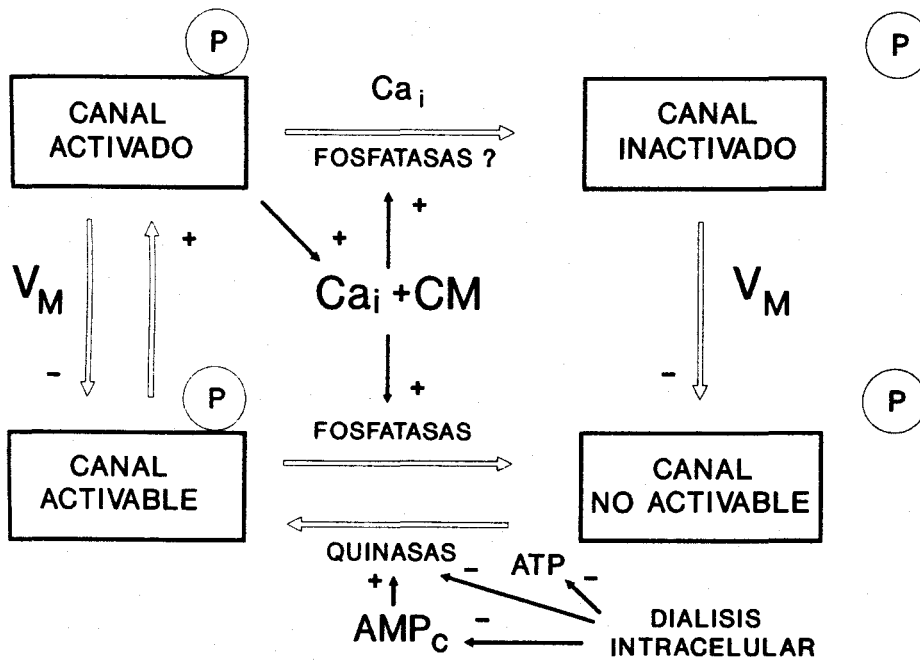


Figura 45. Esquema simplificado de la regulación metabólica de la corriente de Ca^{2+} en células glómicas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sobre la regulación metabólica de la corriente de Ca^{2+} pueden resumirse en el esquema propuesto en la figura 45. El canal de Ca^{2+} puede estar en cuatro situaciones funcionales posibles. En reposo, existe un equilibrio entre canales activables (fosforilados y que pueden abrirse con la despolarización) y canales no activables (desfosforilados) debido a la acción de quinasas y fosfatasas intracelulares. Durante la diálisis con soluciones con Ca^{2+} en el rango nM y en ausencia de enzimas o nucleótidos exógenos, se activan fosfatasas endógenas (que posiblemente son proteínas unidas a la membrana y difíciles de dializar) y se favorece la desfosforilación con lo que decrece el número de canales de Ca^{2+} funcionales y la amplitud de la corriente. Este hecho se previene si se disminuye el Ca^{2+} citosólico y se añaden nucleótidos, AMP_c y quinasas o si se

DISCUSION

inhiben las fosfatasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina. Con la despolarización (cambio + en V_M) la apertura de canales de Ca^{2+} produce un incremento de Ca^{2+} citosólico. Como se discutió anteriormente, la inactivación de los canales cuando el potencial de membrana se mantiene despolarizado es un proceso cuyo mecanismo básico se desconoce y la posible implicación de fosfatasas y/o la conducción de los propios iones Ca^{2+} está todavía por determinar.

En resumen, la actividad de los canales de Ca^{2+} de las células glómicas, como los canales tipo L de otras células, está regulada por un balance entre mecanismos favorecedores e inhibidores de la fosforilación. En nuestra preparación una fosfatasa dependiente de calmodulina y la proteína quinasa A parecen ser los enzimas responsables de este equilibrio metabólico, sobre el que posiblemente actúan transmisores, neuromoduladores y señales intracelulares implicadas en la regulación fisiológica de la I_{Ca} en el cuerpo carotídeo.

C) MODULACION DE LA CORRIENTE DE Ca^{2+} POR DOPAMINA Y NORADRENALINA

La dopamina aplicada extracelularmente a las células glómicas produce una disminución de la corriente de Ca^{2+} de forma reversible y selectiva, pues no modifica la corriente de Na^+ ni de K^+ . El efecto bloqueante se produce tanto en la corriente durante el pulso como en el "tail current" y se consigue con un amplio rango de concentraciones (entre 10^{-12} y 10^{-5} M). La inhibición de la corriente es rápida y sigue el curso temporal del recambio de las soluciones en la cámara de registro, al igual que la recuperación del efecto. La dopamina no modifica los parámetros cinéticos voltaje-dependientes de la I_{Ba} y su efecto es independiente del potencial de membrana. Estas observaciones sugieren que el neurotransmisor inhibe la corriente de Ca^{2+} reduciendo el número de canales que se abren con la despolarización.

DISCUSION

Las células tipo I son muy sensibles a la acción de DA puesto que a concentraciones pM se observa una reducción apreciable de la I_{Ba} . Aunque no se llevó a cabo un estudio farmacológico sobre la interacción dopamina-receptor, nuestros datos sugieren que el receptor es de muy alta afinidad (K_D en el rango pM) compatible con los valores estimados para varios receptores de dopamina (por ejemplo los receptores del tipo D_2) y para otros neurotransmisores y hormonas (Seeman et al., 1976, 1986; Watanabe et al., 1985).

El análisis del efecto de DA a diferentes concentraciones dió un resultado aparentemente paradójico, pues la DA en el rango pM y subnM redujo la corriente en mayor proporción que en el rango μ M (véase tabla VI de "RESULTADOS"). La reversibilidad del efecto descarta que se deba al lavado de los canales de Ca^{2+} , aunque la recuperación parcial de la corriente tras retirar la DA que se observa en algunas células y su disminución progresiva con exposiciones repetidas podría explicarse por este fenómeno. El efecto paradójico de las diferentes concentraciones de DA puede deberse a que la aplicación del neurotransmisor no fue instantánea, ya que el recambio de la solución que perfunde la cámara de registro tarda unos 15-20 segundos en producirse. Puesto que el efecto de la DA es rápido, en este tiempo podría reducirse la amplitud de la corriente antes de la aplicación de un nuevo pulso de potencial y, por lo tanto, el primer barrido tras la exposición a DA se obtendría cuando la mayoría de los receptores se han desensibilizado. De igual forma, la aplicación repetida de DA produce una reducción de la I_{Ba} que es cada vez menor, lo que posiblemente es el resultado de la acumulación de la desensibilización del receptor o bien consecuencia del gasto de metabolitos intracelulares necesarios para la acción de la DA.

La aplicación de DA de forma mantenida produce una inhibición pronunciada de la corriente de Ba^{2+} que decrece conforme transcurre el tiempo de aplicación, llegando a recuperarse parcial o totalmente la amplitud de la corriente inicial. Este

DISCUSION

fenómeno es similar al de desensibilización descrito por Katz y Thesleff (1957) en el receptor nicotínico de acetilcolina y posteriormente en la mayoría de canales iónicos regulados por ligandos (Hille, 1984). La desensibilización del efecto de DA en las células glómicas es más evidente a bajas concentraciones del neurotransmisor que a dosis altas (véase tabla VII), lo que, en principio, es también paradójico si se considera que la desensibilización de un receptor requiere el estado previo de asociación agonista-receptor. Nuestras observaciones experimentales son compatibles, sin embargo, con el modelo de interacción ligando-receptor que se expuso en la Fig. 41 (ver "RESULTADOS"). Este modelo se ha construido para utilizarlo como explicación cualitativa de nuestros resultados y no pretende aportar información sobre los mecanismos moleculares subyacentes ya que la acción de la DA sobre los canales de Ca^{2+} no puede considerarse como ejemplo típico de interacción directa ligando-canal iónico. Como se discute más adelante, el efecto de la DA posiblemente está mediado por una cascada bioquímica (en la que quizás interviene una proteína G) por lo que no es posible determinar en qué (o en cuáles) interacciones químicas se produce la desensibilización.

En nuestro modelo (ver Fig. 41) el ligando (A) se une a su receptor específico (R) con una constante de afinidad alta y se forma el complejo ligando-receptor, que puede estar en un estado activo en el que se ejerce el efecto inhibitor sobre el canal iónico (AR) pero que rápidamente pasa a otro estado inactivo o desensibilizado (AR_D). El tiempo de vida medio del estado AR decrece con la concentración de agonista y por esta razón a concentraciones altas de DA la desensibilización es muy rápida. En estas condiciones el efecto atenuante "aparente" sobre I_{Ca} es menor que a dosis más bajas, donde el tiempo de vida medio del estado AR es mayor. A concentraciones altas de DA lo que posiblemente se observa es la última fase de la desensibilización cuyo curso temporal lento podría explicarse por acumulación de moléculas en el estado AR_D y recirculación por el estado AR (ver Fig. 41).

DISCUSION

Al igual que ocurre en otras células donde la inhibición de los canales de Ca^{2+} por neurotransmisores (dopamina entre ellos) está mediada por una proteína G (Holz et al., 1986; Harris-Warrick et al., 1988), en el cuerpo carotídeo se diseñaron experimentos para probar si un mismo mecanismo interviene en el efecto modulador de la DA sobre los canales de Ca^{2+} . En base al esquema de la figura 45 es lógico asumir que la interacción ligando-receptor podría activar a una proteína G_i y producir una disminución en la concentración intracelular de AMP_c , resultando en desfosforilación de los canales de Ca^{2+} y disminución de su actividad. Se sabe que algunos receptores de DA están asociados a proteínas G (Senogles et al., 1987) y que la interacción DA con receptores D_2 produce una disminución del AMP_c citosólico (Seeman et al., 1986). El tipo de receptor está por determinar ya que recientemente se han descrito nuevos receptores para DA y se sabe que existe una alta homología del gen que codifica el receptor D_4 con los genes de los tipos D_2 y D_3 (Van Tol et al., 1991), mientras que el tipo D_5 está relacionado con el D_1 (Sunahara et al., 1991) pues ambos estimulan la adenil ciclasa e incrementan los niveles intracelulares de AMP_c . Alternativamente, la disociación de la subunidad α de la proteína G podría actuar directamente sobre los canales iónicos (Brown y Birnbaumer, 1988) independientemente de su acción sobre la adenil ciclasa.

La posible participación de una proteína G en la regulación de la I_{Ca} de las células tipo I se comprobó mediante los experimentos donde se utilizaron análogos no hidrolizables del GTP, que activan permanentemente la proteína G (Gilman, 1987). En presencia de $\text{GTP}\gamma\text{S}$ intracelular la DA inhibe la I_{Ba} de forma irreversible, lo que sugiere que la proteína G continúa activa al retirar el neurotransmisor. La incubación de las células con toxina pertussis (PTX), una toxina bacteriana que produce la ADP-ribosilación de la proteína G e impide su activación por GTP (ver Dolphin, 1987), debería evitar el efecto de DA, pero en nuestros experimentos no dió el resultado esperado. Las células tipo I se preincubaron 12 horas con la toxina y en ellas la DA inhibió reversiblemente la I_{Ba} de igual forma que en las células

DISCUSION

controles. Este último resultado negativo no cuestiona lo observado con GTP γ S ya que no tenemos pruebas definitivas de que la actividad de la PTX que se usó o el tiempo de incubación fuesen los adecuados. La ausencia de efecto de la incubación con PTX podría también deberse a que el lugar de ADP-ribosilación de la proteína G no fuera accesible a la toxina por estar situado en un "pool" oculto o bien que la difusión de la PTX fue deficiente y no se distribuyó de forma adecuada en la cara interna de la membrana celular.

La noradrenalina (NA) actúa de forma similar a la DA sobre la corriente de Ca $^{2+}$ de las células tipo I pero con un efecto menos potente. El posible mecanismo de acción de la NA está aún por determinar, aunque, al igual que la DA, su acción podría estar mediada por una proteína G. Existen evidencias sobre la existencia de receptores presinápticos α -adrenérgicos que ligan noradrenalina y producen inhibición de la corriente de Ca $^{2+}$ a través de la activación de una proteína G (Lipscombe et al., 1989).

D) IMPLICACION DE LA CORRIENTE DE Ca $^{2+}$ Y DE SU MODULACION EN LA FISIOLOGIA DEL CUERPO CAROTIDEO

El cuerpo carotídeo es un quimiorreceptor arterial donde el estímulo fisiológico provoca como respuesta la liberación de acetilcolina, catecolaminas y neuropéptidos. La respuesta secretora es, como en otros sistemas celulares, dependiente de calcio extracelular (Fidone et al., 1982; Fishman et al., 1985). Aunque en el mecanismo de quimiotransducción primario no participan los canales de Ca $^{2+}$, ya que éste se debe a la existencia de un canal de K $^{+}$ sensible a los cambios de la tensión de O $_2$ (López-Barneo et al., 1988; Ganfornina y López-Barneo, 1991), el estudio de los canales de Ca $^{2+}$ es de importancia fundamental ya que de ellos depende la entrada de Ca $^{2+}$ al citosol y por lo tanto la secreción. En respuesta a la hipoxia, el bloqueo de canales de K $^{+}$ produce en las

DISCUSION

células tipo I un aumento en la frecuencia de potenciales de acción, que se producen por la apertura de los canales de Na^+ y Ca^{2+} (López-López et al., 1989). Los canales de Ca^{2+} descritos en este trabajo están perfectamente diseñados para, como en otras células secretoras, producir una inyección rápida de Ca^{2+} al citosol.

El cuerpo carotídeo es un órgano muy complejo donde además de las sinapsis aferentes entre las células tipo I y las fibras nerviosas sensoriales, existen sinapsis eferentes de las fibras sensoriales y terminaciones simpáticas con las propias células tipo I (Fidone y González, 1986). Es por lo tanto lógico pensar que en paralelo al proceso básico de quimiotransducción se superpongan mecanismos de regulación de la secreción. En este sentido los resultados de nuestro trabajo son de interés pues demuestran que los canales de Ca^{2+} están sujetos a regulación metabólica y por los propios productos de secreción de las células tipo I.

Las células tipo I liberan catecolaminas y neuropéptidos y se ha sugerido que estas sustancias podrían actuar sobre autoreceptores de las propias células glómicas (Dinger et al., 1986; Eyzaguirre et al., 1990). En este trabajo se aportan evidencias directas que indican que la respuesta quimiosensora se modula por los propios productos de secreción. Se ha demostrado que las catecolaminas (sobre todo la DA) inhiben la I_{Ca} en células tipo I y sería interesante estudiar en el futuro si los neuropéptidos (sustancia P y encefalinas) tienen el mismo efecto. La autoregulación de la secreción es un proceso que se ha descrito en otras preparaciones. Mediante experimentos farmacológicos se ha mostrado que la liberación de catecolaminas en células cromafines provocada por agonistas nicotínicos se inhibe por dopamina (Artalejo et al., 1985) y en neuronas simpáticas se ha descrito que la interacción de noradrenalina con receptores presinápticos α -adrenérgicos inhibe canales de Ca^{2+} de alto umbral y la secreción (Lipscombe et al., 1989). En el cuerpo carotídeo el mecanismo de autoinhibición por DA es de muy alta afinidad (se necesitan concentraciones de al menos dos órdenes de magnitud inferiores a la descritas para

DISCUSION

la acción de la NA en neuronas simpáticas) y está sujeto a desensibilización dependiente de la concentración del neurotransmisor. Es por lo tanto un sistema de autoinhibición complejo pero que, al contrario que en otras preparaciones, puede abordarse experimentalmente con relativa facilidad. La modulación de la I_{Ca} por DA (y quizás por otros agentes) es un modelo atractivo para plantear nuevas hipótesis sobre los mecanismos moleculares subyacentes y para abordar un estudio detallado de las características cinéticas del proceso de desensibilización.

La autoinhibición de la I_{Ca} por DA puede tener un papel importante en la fisiología del cuerpo carotídeo. Al nivel celular, la liberación de DA en hipoxia extrema posiblemente limita la excesiva degranulación o la entrada masiva de Ca^{2+} que podría producir alteraciones irreversibles en la células; al nivel sistémico la autoinhibición por DA puede contribuir a la adaptación del cuerpo carotídeo ante la exposición permanente a bajas PO_2 . Aunque los datos que se obtienen en células aisladas son difíciles de extrapolar a los descritos con el cuerpo carotídeo completo o in vivo, los resultados del presente trabajo ayudan a explicar numerosas observaciones previas. Se sabe que la dopamina aplicada exógenamente produce depresión de la actividad quimiosensorial aferente del cuerpo carotídeo (Folgering et al., 1982; Mac Queen, 1984) y que este transmisor está implicado en la adaptación de la descarga aferente del nervio del seno carotídeo durante la aclimatación a hipoxia (Ponte y Sadler, 1989; Kaiying Li et al., 1990). La adaptación a hipoxia es mayor con bajas PO_2 , lo que podría explicarse por una liberación inicial y posterior inhibición por bloqueo de la I_{Ca} . Los experimentos realizados in vivo sobre el papel de la DA (y otros posibles agentes) en los procesos adaptativos del cuerpo carotídeo por diferentes laboratorios son, en ocasiones, contradictorios ya que en esas condiciones experimentales los sitios de acción de la DA podrían ser múltiples. En estas condiciones experimentales las concentraciones efectivas de DA en el cuerpo carotídeo se desconocen y por lo tanto el estado de los receptores puede ser muy variable.

CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo se ha estudiado la corriente de Ca^{2+} de células tipo I del cuerpo carotídeo de conejo dispersas en cultivo primario utilizando la configuración de célula completa ("whole-cell") de la técnica de "patch-clamp".
2. Las células glómicas poseen canales iónicos voltaje-dependientes específicos para Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , son excitables y generan potenciales de acción espontáneamente con un componente de calcio.
3. Las células tipo I poseen una población homogénea de canales de Ca^{2+} de alto umbral o de deactivación rápida que se inactivan lentamente dependiendo de Ca^{2+} extracelular. La cinética de activación de la corriente de Ca^{2+} depende del potencial de membrana y su cinética de cierre es rápida y se ajusta a una función exponencial sencilla en la mayoría de las células estudiadas.
4. La sustitución del Ca^{2+} extracelular por Ba^{2+} produce un aumento en la conductancia de los canales de Ca^{2+} y modificaciones en sus características cinéticas. Cuando se usa Ba^{2+} como transportador de carga la relación corriente-voltaje y la

CONCLUSIONES

curva conductancia-voltaje se desplaza unos 15 mV hacia voltajes más negativos. La inactivación observada en presencia de Ca^{2+} extracelular desaparece cuando se sustituye por Ba^{2+} , y con este ion la cinética de cierre de la corriente de Ca^{2+} es más lenta.

5. Los metales de transición Cd^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} añadidos al medio extracelular a concentraciones μM actúan como bloqueantes de la corriente de Ca^{2+} , siendo el efecto reversible con Cd^{2+} y Ni^{2+} y no así con Co^{2+} . La potencia relativa de bloqueo es $\text{Cd}^{2+} > \text{Ni}^{2+} \approx \text{Co}^{2+}$.

6. Las dihidropiridinas inhiben de forma selectiva la corriente de Ca^{2+} sin modificar la corriente de Na^+ ni de K^+ . La nifedipina en el rango μM reduce la I_{Ca} de forma potente, reversible y dependiente de V_{M} , y acelera el curso temporal de la activación, sin alterar la cinética de cierre. La elgodipina (una dihidropiridina de reciente aparición) a concentraciones nM disminuye la I_{Ca} reversiblemente. Su efecto no depende del potencial y no modifica las características cinéticas ni los parámetros voltaje-dependientes de la corriente de Ca^{2+} . La elgodipina en el rango 10^{-11} M tiene actividad agonista sobre la I_{Ca} , que aumenta de forma reversible de forma similar a la descrita en otras dihidropiridinas.

7. La corriente de Ca^{2+} de las células glómicas tiende a desaparecer rápidamente cuando se registra en el modo "whole-cell". Este fenómeno se denomina "lavado de la corriente", es específico de la I_{Ca} (no se observa en I_{Na} ni en I_{K}) y se debe a la pérdida de constituyentes moleculares del citosol al dializarse por la solución salina de la micropipeta. La corriente de Ca^{2+} está sujeta a una importante regulación metabólica que determina el estado funcional de los canales de Ca^{2+} . Con una concentración de Ca_i del orden nM el lavado de la corriente es muy rápido, y se enlentece añadiendo EGTA o BAPTA en la solución interna. La presencia de ATP y AMP_c y quelantes de calcio retrasa el proceso de lavado. La subunidad catalítica

CONCLUSIONES

de la proteína quinasa A interviene en el control metabólico de la corriente de Ca^{2+} junto con ATP y AMP_c produciendo en último término la fosforilación de los canales de Ca^{2+} y manteniendo de este modo su integridad funcional. Nuestros datos muestran que la inactivación y el lavado de la corriente son fenómenos cuya base molecular es distinta.

8. La trifluorperacina (un agente que inactiva los procesos que dependen de Ca^{2+} /calmodulina) retrasa el lavado de I_{Ca} , indicando la existencia de fosfatasa intracelulares que regulan la actividad de los canales de Ca^{2+} favoreciendo su desfosforilación. El mantenimiento de canales de Ca^{2+} funcionales depende por tanto del equilibrio en la actividad de quinasas y fosfatasa intracelulares.

9. La dopamina, que es un transmisor secretado por las células glómicas, inhibe de forma selectiva y reversible la corriente de Ca^{2+} . El efecto es rápido y se consigue con un amplio rango de concentraciones, entre 10^{-12} y 10^{-5} M. La dopamina no modifica los parámetros cinéticos voltaje-dependientes de la I_{Ca} y su acción es independiente del potencial de membrana. La disminución de la corriente de Ca^{2+} por dopamina es mayor a concentraciones bajas (nM y pM) que altas (μM) y en aplicaciones prolongadas el efecto inhibitor de la I_{Ca} se atenúa conforme transcurre la exposición al transmisor. Esta desensibilización es más evidente a bajas concentraciones de DA. Las exposiciones repetidas a DA producen un efecto cada vez menor y una desensibilización más lenta. Estas observaciones se pueden explicar mediante un modelo simplificado que asume varios estados funcionales del complejo ligando-receptor.

10. La presencia de análogos no hidrolizables del GTP en la solución interna de registro hace que el efecto de DA sobre la corriente de Ca^{2+} sea irreversible. Puesto que se ha descrito la participación directa de proteínas con actividad GTPasa en la

CONCLUSIONES

modulación de canales iónicos de otras células, se sugiere un mecanismo similar para el efecto de la DA sobre la corriente de Ca^{2+} de las células glómicas.

11. La noradrenalina actúa de forma similar a la DA sobre la corriente de Ca^{2+} pero con un efecto menos potente. La inhibición por NA de la I_{Ca} es reversible y el efecto se observa al aplicar el transmisor repetidamente.

12. La inhibición de la corriente de Ca^{2+} por catecolaminas forma parte de un mecanismo de regulación de la secreción en las células tipo I donde la respuesta quimiosensora se modula por los propios productos de secretados. Este sistema de autoregulación de la actividad secretora de las células glómicas es muy sensible, está sujeto a desensibilización y es similar al descrito en otras preparaciones, como por ejemplo la inhibición presináptica por receptores α -adrenérgicos. El papel fisiológico de la autorregulación por dopamina puede ser importante no sólo a nivel celular limitando la respuesta secretora a estímulos de hipoxia extrema, sino que también, desde un punto de vista sistémico, posiblemente contribuye a la adaptación que se observa durante exposiciones prolongadas a bajas presiones parciales de O_2 .

REFERENCIAS

- Acker, H. y. F. Petruschka. "Meaning of the type I cell for the chemoceptive process. An electrophysiological study on cultured type I cells of the carotid body." en *Chemoreception in the Carotid Body*, Ed. Acker, Fidone, Pallot, Eyzaguirre, Lübbers y Torrance. Berlin, Springer., p 92-98, 1977.
- Adelman, W. J., Senft, J.P. "Voltage clamp studies of the effect of internal cesium ion on sodium and potassium currents in the squid giant axon." *Journal of General Physiology*, 50:279-293, 1966.
- Almaraz, L. González, C. y Obeso, A. "Effects of high potassium on the release of ³H-Dopamine from the cat carotid body in vitro." *Journal of Physiology*, 379:293-307, 1986.
- Armstrong, C. M., y Matteson, R.D. "Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells." *Science*, 227:65-67, 1985.
- Armstrong, D. L. "Calcium channel regulation by calcineurin, a Ca²⁺-activated phosphatase in mammalian brain." *Trends in Neurosciences*, 12:117-122, 1989.
- Armstrong, D. y Eckert, R. "Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization." *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 84:2518-2522, 1987.
- Artalejo, C. García, A.G., Montiel, C. y Sánchez-García, P. "A dopaminergic receptor modulates catecholamine release from the cat adrenal gland." *Journal of Physiology*, 362:359-368, 1985.
- Bean, B. P. "Classes of calcium channels in vertebrate cells." *Annual Review of Physiology*, 51: 367-384, 1989.

REFERENCIAS

- Bean, B. P. "Two kinds of calcium channels in canine atrial cells." *Journal of General Physiology*, 86:1-30, 1985.
- Bean, B. P., Nowycky, M.C. y Tsien, R.W. " β -Adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart cells." *Nature*, 307:371-375, 1983.
- Belmonte, C. y González, C. "Mechanisms of chemoreception in the carotid body: possible models. en "Physiology of the Peripheral Arterial Chemoreceptors. H. Acker y R.G. O'Reagan Eds. Elsevier Sci. Publ. Amsterdam, págs. 197-220, 1983.
- Benham, C. D.. y Tsien, R.W. "A novel receptor -operated Ca^{2+} -permeable channel activated by ATP in smooth muscle." *Nature*, 328:275-278, 1987.
- Benot, A. R.. y López-Barneo, J. "Feedback Inhibition of Ca^{2+} Currents by Dopamine in Glomus Cells of the Carotid Body." *European Journal of Physiology*, 2:809-812, 1990.
- Bezanilla, F. y. Armstrong, C.M. "Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments." *Journal of General Physiology*, 70:549-566, 1977.
- Bezanilla, F. y. Armstrong, C.M. "Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons." *Journal of General Physiology*, 60:588-608, 1972.
- Birnbaumer, L. Codina, J., Mattera, R., Yatani, A., Scherer, N., Toro, M.J. y Brown, A.M. "Signal transduction by G proteins." *Kidney International*, 32:S14-S17, 1987.
- Boll, W. y. Lux, H.D. "Action of organic antagonists on neuronal calcium currents." *Neuroscience Letters*, 56:335-359, 1985.
- Bonvallet, R. "A low threshold calcium current recorded at physiological Ca concentration in single frog atrial cells." *Pflüegers Archiv*, 408:540-542, 1987.
- Brown, A. M., Kunze, D.L. y Yatani, A. "The agonist effect of dihydropyridines on Ca channels." *Nature*, 311:570-572, 1984.
- Brown, A. M., y Birnbaumer, L. "Direct G protein gating of ion channels." *American Journal of Physiology*, 254:H401-H410, 1988.

REFERENCIAS

- Byerly, L. y Hagiwara, S. "Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of *Lymaea stagnalis*." *Journal of Physiology*, 322:503-528, 1982.
- Cachelin, A. B., dePeyer, J.E., Kokubun, S. y Reuter, H. "Calcium channel modulation by 8-bromo-cyclic AMP in cultured heart cells." *Nature*, 304:402-404, 1983.
- Carbone, E. Swandulla, D y Lux, H.D. "Block and modulation of neuronal Ca channels by catecholamines, cyclic alcohols and nickel." en *Voltage-Sensitive Ion Channels: Modulation by Neurotransmitters and drugs*. Fidia Research Series, Symposia in Neuroscience. Liviana Press, Padova, págs. 97-106, 1988.
- Carbone, E. y Lux, H.D. "Kinetics and selectivity of a low-voltage activated calcium current in chick and rat sensory neurons." *Journal of Physiology*, 386:547-570, 1987.
- Carbone, E. y Lux, H.D. "A low voltage activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones." *Nature*, 310: 501-511, 1984.
- Castellano, A. y López-Barneo, J. "Sodium and calcium currents in dispersed mammalian septal neurons." *Journal of General Physiology*, 97:303-320, 1991.
- Chad, J. E. y Eckert, R. "An enzymatic mechanism for calcium current inactivation in dialysed *Helix* neurones." *Journal of Physiology*, 378: 31-51, 1986.
- Chow, R. H. y Armstrong, C.M. "Cadmium block of calcium currents in squid neurons." *Biophysical Journal*, 53:554a, 1988.
- Cole, K. S. "Membranes, ions and impulses: a chapter of classical biophysics." University of California Press, Berkeley, págs. 569, 1968.
- Cota, G. "Calcium channels currents in pars intermedia cells of the rat pituitary gland." *Journal of General Physiology*, 88:83-105, 1986.
- Curtis, B. M. y Catterall, W.A. "Phosphorylation of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel by cAMP-dependent protein kinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 82:2528-2532, 1985.

REFERENCIAS

- De Castro, F. "Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome du nerf glossopharyngien." *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid*, 24:365-432, 1926.
- De Castro, F. "Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères. Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. Etudes anatomiques et physiologiques." *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid*, 25:331-380, 1928.
- Delpiano, M. A., Starlinger, H., Fisher, H. y Acker, H. "The cAMP content of the cat carotid body in vivo and in vitro under normoxia and after stimulation by hypoxia." En "The Peripheral Arterial Chemoreceptors" (Pallot D. Ed.), p. 401-408, 1984.
- Delpiano, M. A. y Hescheler, J. "Evidence for a PO₂-sensitive K channel in the type-I cell of the rabbit carotid body." *Febbs Letters*, 249: 195-198, 1989.
- DeRiemer, S. A., Strong, J.A., Albert, K.A., Greengard, P. y Kaczmarek, L.K. "Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C." *Nature*, 313:313-316, 1985.
- Dinger, B. González, C., Yoshizaki, K., y Fidone, S. "³H-Spiroperidol binding in normal and denervated carotid bodies." *Neuroscience Letters*, 21:51-55, 1981.
- Dinger, B. Hirano, T. y Fidone, S. "Autoradiographic localisation of muscarinic receptors in rabbit carotid body." *Brain Research*, 36:328-331, 1986.
- Dolphin, A. C. "G protein modulation of calcium currents in neurons." *Annual Review of Physiology*, 52:243-255, 1990.
- Dolphin, A. C. "Nucleotide binding proteins in signal transduction and disease." *Trends in Neuroscience*, 10:53-57, 1987.
- Doroshenko, P. A., Kostyuk, P.G., Martynyuk, A.E., Kursky, M.D. y Vorobetz, Z.D. "Intracellular protein kinase and calcium inward currents in perfused neurones of the snail *Helix pomatia*." *Neuroscience*, 11:263-267, 1984.

REFERENCIAS

- Duchen, M. R., Caddy, K., Kirby, G.C., Patterson, D., Ponte, J. y Biscoe, T.J. En "Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body." *Neuroscience*, 26:291-311, 1988.
- Dunlap, K. y Fischblach, G.D.: "Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurones action potentials." *Nature*, 276:837-839, 1978.
- Dunlap, K. y Fischbach, G.D. "Neurotransmitter decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones." *Journal of Physiology*, 317:519-535, 1981.
- Ellis, S. B., Williams, M.E., Ways, N.R., Brenner, R. Sharp, A.H., Leung, A.T., Campbell, K.P., McKenna, E., Koch, W.J., Hui, A., Schwartz, A., Harpold, M.M. "Sequence and expression of mRNAs encoding $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits of a DHP-sensitive calcium channel." *Science*, 241: 1661-1664, 1988.
- Eyzaguirre, C. Monti-Bloch, L., Hayasida, Y. y Barón, M. "Biophysics of the carotid body receptor complex." En "Physiology of the Peripheral Arterial Chemoreceptors". H. Acker y R.G. O'Reagan, eds. Elsevier Science Publish. Co. Inc. Amsterdam, p 59-88, 1983.
- Eyzaguirre, C. Monti-Bloch, L. y Woodbury, J.W. "Effects of putative neurotransmitters of the carotid body on its own glomus cells." *European Journal of Neuroscience*, 2:77-88, 1990.
- Eyzaguirre, C. y Zapata, P. "Perspectives in carotid body research." *Journal of Applied Physiology: Respirat. Environ. Exercise Physiology*, 57:931-937, 1984.
- Fatt, P. y Katz, B. "The electrical properties of crustacean muscle fibres." *Journal of Physiology*, 120: 171-204, 1953.
- Fedulova, S. A., Kostyuk, P.G. y Veselovsky, N.S. "Calcium channels in the somatic membrane of the rat dorsal root ganglion neurons. Effect or cAMP." *Brain Research*, 214:210-214, 1981.
- Feltz, A. y Trautmann, A. "Desensitization at the frog neuromuscular junction: A biphasic process." *Journal of Physiology*, 322:257-272, 1982.

REFERENCIAS

- Fenwick, E. M., Marty, A. y Neher, E. "Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells." *Journal of Physiology*, 331:599-635, 1982.
- Fidone, S. González, C., y Yoshizaki, K. "Effects of hypoxia on catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro." *Journal of Physiology*, 333:81-91, 1982a.
- Fidone, S. González, C. y Yoshizaki, K. "Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body in vitro." *Journal of Physiology*, 333:93-110, 1982b.
- Fidone, S. y González, C. Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. *Handbook of Physiology. The respiratory system II*. American Physiological Society, Bethesda, MD. págs. 247-312, 1986.
- Fishman, M. C., Greene, W.L. y Platika, D. "Oxygen chemoreception by carotid body cells in vitro." *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 82:1448-1450, 1985.
- Fitzgerald, R. S. y Lahiri, S. "Reflex responses to chemoreceptor stimulation." en *Handbook of Physiology. The respiratory System II*. A.P. Fishman, Ed. American Physiological Society, Bethesda, MD, págs. 313-362, 1986.
- Fleckenstein, A. "Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle." *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 17:149-166, 1977.
- Folgering, H. Ponte, J. y Sadig, T. "Adrenergic mechanisms and chemoreception in the carotid body of the cat and rabbit." *Journal of Physiology*, 325:1-21, 1982.
- Forscher, P. y Oxford, G.S. "Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons." *Journal of General Physiology*, 85:743-763, 1985.
- Fosset, M. Jaimovich, E., Delpont, E. y Lazdunski, M. "[H3]nitrendipine receptors in skeletal muscle. Properties and preferential localization in transverse tubules." *Journal of Biological Chemistry*, 258:6086-6092, 1983.

REFERENCIAS

- Fox, A. P., Nowycky, M.C. y Tsien, R.W. "Kinetics and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones." *Journal of Physiology*, 394:149-172, 1987.
- Fox, A. P. "Voltage-dependent inactivation of a calcium channel." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 78:953-956, 1981.
- Ganformina, M. D., y López-Barneo, J. "Single K channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 88:2927-2930, 1991.
- Gilman, A.G. "G proteins: transducers of receptor-generated signals." *Annual Review of Biochemistry*, 56:615-649, 1987.
- Glossmann, H. Striessnig, J., Kymel, L., Zernig, G, Knaus, H.G., Schindler, H. "The structure of the Ca channel: photoaffinity labelling and tissue distribution." En "The Calcium Channel: Structure, Functions and implications". Ed. Morad, Naylor, Kazda, y Schramm. Berlin, Springer., p. 168-129, 1988.
- Goldman, W. F. y Eyzaguirre, C. "The effects of dopamine on glomus cells membranes in the rabbit." *Brain Research*, 321:337-340, 1984.
- Gómez, L. P. "The anatomy and pathology of the carotid gland." *Am. J. Med. Sci.*, 98-111, 1908.
- Gross, R. A., Uhler, M.D. y MacDonald, R.L. "The cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit selectively enhances calcium currents in rat nodose neurones." *Journal of Physiology*, 429:483-496, 1990.
- Gross, R. A.: y McDonald, R.L. "Dynorphin A selectively reduces a large transient (N-type) calcium current of mouse dorsal root ganglion neurons in cell culture." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 84:5469-5473, 1987.
- Hagiwara, S. y Byerly, L. "Calcium Channel." *Annual Review of Neuroscience*, 4:61-125, 1981.
- Hagiwara, S. y Byerly, L. "The calcium channel." *Trends in Neurosciences*, 6:189-193, 1983.

REFERENCIAS

- Hagiwara, S. y Ohmori, H. "Studies on calcium channels in rat clonal pituitary cells with patch electrode voltage-clamp." *Journal of Physiology*, 65:617-644, 1982.
- Hagiwara, S. y Takahashi, K. "Surface density of calcium ion and calcium spikes in the barnacle muscle fiber membrane." *Journal of General Physiology*, 50, p. 583-601, 1967.
- Hagiwara, S. Ozawa, S. y Sand, O. "Voltage analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish." *Journal of General Physiology*, 65:617-644, 1975.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sackmann, B. y Sigworth, F.J. "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." *Pflügers Archiv*, 391:85-100, 1981.
- Harris-Warrick, R. M., Hammond, C., Paupardin-Trisch, D., Homburger, V., Rouot, B., Bockaert, J. y Gerschenfeld, H.M. "An $\alpha 40$ subunit of a GTP-binding protein immunologically related to Go mediates a dopamine-induced decrease of Ca^{2+} current in snail neurons." *Neuron*, 1:27-32, 1988.
- Hartzell, H. C. y Fischmeister, R. "Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca currents in single heart cells." *Nature*, 323:273-275, 1986.
- Hescheler, J. Rosenthal, W., Trautwein, W. y Schultz, G. "The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels." *Nature*, 325:445-447, 1987.
- Hess, P. "Calcium channels in vertebrate cells". *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 337-356: 1990.
- Hess, P. Lansman, J.B., y Tsien, R.W. "Different modes of Ca channel gating behaviour favored by dihydropyridine Ca agonists and antagonists." *Nature*, 311:538-544, 1984.
- Heymans, C. Bouckaert, J.J. y Dautrebande, L. "Sinus carotidien et réflexes respiratoires. II: Influences respiratoires réflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de l'ion hydrogène et de l'anoxemie: sinus carotidiens et échanges respiratoires dans les poumons et au delà des poumons." *Arch. Int.*

REFERENCIAS

- Pharmacodyn. Ther., 39:400-408, 1930.
- Hille, B. "Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves." *Nature*, 210:1220-1222, 1966.
- Hille, B. "Ionic Channels of Excitable Membranes." Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, 1984.
- Hille, B. "Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction." *Journal of General Physiology*, 69:497-515, 1977.
- Hille, B. "A pharmacological analysis of the ionic channels of nerve." Ph.D. Thesis. The Rockefeller University, University Microfilms, Ann Harbor, Michigan (Microfilm 68-9584), 1967.
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A.F. "Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*." *Journal of Physiology*, 116:449-472, 1952.
- Holz, G. G., Rane, S.G. y Dunlap, K. "GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels." *Nature*, 319:670-672, 1986.
- Hosey, M. M., Lazdunski, M. "Calcium channels: Molecular pharmacology, structure and regulation." *Journal of Membrane Biology*, 104:81-105, 1988.
- Hosey, M. M., Borsotto, M. y Lazdunski, M. "Phosphorylation and dephosphorylation of the major component of the voltage-dependent Ca channel in skeletal muscle membranes by cAMP and Ca-dependent process." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 83: 3733-3737, 1986.
- Imagawa, T. Leung, A.T. y Campbell, K.P. "Phosphorylation of the 1-4 dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca channel by an intrinsic protein kinase in isolated triads from rabbit skeletal muscle." *Journal of Biological Chemistry*, 262:8333-8339, 1987.
- Ingebritsen, T. S. y Cohen, P. "Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation." *Science*, 221:331-338, 1983.

REFERENCIAS

- IQB-Instituto de Investigación y Desarrollo Químico-Biológico, S. A.
"Investigator's Brochure covering Elgodipine (IQB-875)." Documentación científica del IQB-Delagrange, Revisión nº 3, Abril, 1990.
- Janis, R. A., Silver, P.J., Triggle, D.J. "Drug action and cellular calcium regulation." *Advances in Drug Research*, 16:309-591, 1987.
- Kaczmarek, L. K. "The Regulation of Neuronal Calcium and Potassium Channels by Protein Phosphorylation." *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. Ed. P. Greengard y G.A. Robinson, Raven Press, NY., 22:113-139, 1988.
- Kaczmarek, L. K. "The role of protein kinase C in the regulation of ion channels and neurotransmitter release." *Trends in Neurosciences*, 10: 30-34, 1987.
- Kaiying Li, Ponte J. y Sadler, C.L. "Carotid body chemoreceptor response to prolonged hypoxia in the rabbit: effects of domperidone and propranolol." *Journal of Physiology*, 430:1-11, 1990.
- Kameyama, M. Kameyama, A., Nakayama, T. y Kaibara, M. "Tissue extract recovers cardiac calcium channels from "run down". " *Pflügers Archiv*, 412:328-330, 1988.
- Kasai, H. Aosaki, T y Fukuda, J. "Presynaptic Ca-agonist w-conotoxin irreversibly blocks N-type Ca-channels in chick sensory neurons." *Neuroscience Research*, 4:228-235, 1987.
- Katz, B. y Thesleff, S. "A study of the "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end plate." *Journal of Physiology*, 138:63-80, 1957.
- Klöckner, U. e Isemberg, G. "The dihydropyridine nifedipine modulates calcium and potassium currents in vascular smooth muscle cells." *British Journal of Pharmacology*, 97:957-967, 1989.
- Kohlhardt, M. Bauer, M., Krause, H y Fleckenstein, A. "Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors." *Pflügers Archiv*, 335:309-322, 1972.
- Kostyuk, P. G. "Calcium channels in the neuronal membrane." *Biochim. Biophys. Acta*, 650: 128-150, 1981.

REFERENCIAS

- Kostyuk, P. G. "Metabolic control of ionic channels in the neuronal membrane." *Neuroscience*, 13:983-989, 1984.
- Lansman, J. B., Hess, P. y Tsien, R.W. "Blockade of current through single calcium channels by Cd, Mg and Ca. Voltage and concentration-dependence of Ca entry into the pore." *Journal of General Physiology*, 88:321-347, 1986.
- Lee, K. S., y Tsien, R.W. "Mechanism of calcium blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells." *Nature*, 302:790-794, 1983.
- Lipscombe, D. Kogsamut, S. y Tsien, R.W. " α -adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating." *Nature*, 340:639-642, 1989.
- Llinas, R. y Yarom, Y. "Electrophysiology of the mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage dependent ionic conductances." *Journal of Physiology*, 315:549-567, 1981.
- Llinas, R. y Yarom, Y. "Specific blockage of the low threshold calcium channel by high weight alcohols." *Soc. Neurosci. Abstr.* 12:174, 1986.
- López-Barneo, J. López-López, J.R., Ureña, J. y González, C. "Chemotransduction in the carotid body: K current modulated by pO₂ in type I chemoreceptor cells." *Science*, vol. 241, pp. 580-582: 1988.
- López-López, J. González, C., Ureña, J. y López-Barneo, J. "Low PO₂ selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body." *Journal of General Physiology*, 93:1001-1015, 1989.
- Marchetti, C. Carbone, E. y Lux, H.D. "Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick." *Pflügers Archiv*, 406:104-111, 1986.
- Marchetti, C. y Brown, A.M. "Protein kinase activator 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glicerol inhibits two types of calcium currents in GH3 cells." *American Journal of Physiology*, 254:C206-C210, 1988.
- Marty, A. y Neher, E. "Tight-seal whole-cell recording." *Single-Channel Recording*. Ed. B. Sakmann y E. Neher. Plenum Publishing Corp., Nueva

REFERENCIAS

York, págs. 107-122, 1983.

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

Matteson, D. R. y Armstrong, C.M. "Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells." *Journal of General Physiology*, 87:161-182, 1986.

Mazzanti, M. DeFelice, L.J. y Yuan-mou Liu. "Gating of L-type Ca channels in embryonic chick ventricle cells: dependence on voltage, current, and channel density." *Journal of Physiology*, 1991 (en prensa).

McCleskey, E. W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M. "ω-conotoxin: Direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 84:4327-4331, 1987.

McQueen, D. S. "Effects of selective dopamine receptor agonists and antagonists on carotid body chemoreceptor activity." En "The Peripheral Arterial Chemoreceptors." *Proc. 7th. Int. Meet. Ed. by D.J. Pallot. Leicester, UK*, p. 325-333, 1984.

Mikami, A. Imoto, K., Tanabe T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. y Numa, S. "Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine sensitive calcium channel." *Nature*, 340: 230-233.

Miller, R. J. "Multiple Calcium Channels and Neuronal Function." *Science*, 235:46-52, 1987.

Mori, Y. Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Imoto, K., Tanabe, T. y Numa, S. "Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel." *Nature*, 350: 398-402, 1991.

Narahashi, T. More, J.W. y Scott, W.R. "Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons." *Journal of General Physiology*, 47:965-974, 1964.

Neher, E. Sackmann, B. y Setinbach, J.H. "The extracellular patch-clamp: A

REFERENCIAS

- method for resolving currents through individual open channels in biological membranes." *Plügers Archiv*, 375:219-228, 1978.
- Neher, E. y Sackmann, B. "Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." *Nature*, 260:799-802, 1976.
- Nestler, E. J. y Greengard, P. "Protein phosphorylation in the brain." *Nature*, 305:583-588, 1983.
- Nishizuka, Y. "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation." *Nature*, 334:661-665, 1988.
- Noda, S. Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T. "Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence." *Nature*, 312:121-127, 1984.
- Nowycky, M. C., Fox, A.P. y Tsien, R.W. "Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity." *Nature*, 316: 440-443, 1985.
- Obeso, A. Fidone, S. y González, C. "Pathways for calcium entry in type I cells of the carotid body. Significance for the secretory response." en *Chemoreceptors in Respiratory Control*. J.A. Ribeiro and D. Pallot, Eds. London, 91-98, 1987.
- Papazian, D. M., Schwartz, T.L., Tempel, B.L., Jan y L.Y. "Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel from *Drosophyla*." *Science*, 237:749-753, 1987.
- Pérez-García, M. T., Almaraz, L. y González, C. "Effects of Different Types of Stimulation on Cyclic AMP Content in the Rabbit Carotid Body: Functional Significance." *Journal of Neurochemistry*, 55:1287-1293, 1990.
- Plummer, M. R., Logothetis, D.E. y Hess, P. "Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons." *Neuron*, 2:1453-1463, 1989.
- Ponte, J. y Sadler, C.L. "Interactions between hypoxia, acetylcholine and dopamine in the carotid body of the rabbit and cat." *Journal of Physiology*, 410:395-410, 1989.
- Rane, S. G., y Dunlap, K. "Kinase C activator 1,2 oleoylacetyl glycerol

REFERENCIAS

- attenuates voltage-dependent calcium current en sensory neurones." Proceedings of the National Academy of Sciences, 83:184-188, 1986.
- Reuter, H. "Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs." Nature, 301:569-574, 1983.
- Reuter, H. y Scholz, H. "The regulation of the Ca conductance of cardiac muscle by adrenaline." Journal of Physiology, 264:49-62, 1977.
- Rigual, R. González, C. y Fidone, S. "Synthesis and Release of Catecholamines by Cat Carotid Body in vitro: Effects of Hypoxic Stimulation." Brain Research, 374:101-109, 1986.
- Rubin, R. P. "Calcium and the Secretory Process." Plenum Press, N.Y., 1974.
- Sakmann, B. Patlak, J. y Neher, E. "Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing contractions of agonist." Nature, 286:71-73, 1980.
- Sánchez, J. A. y Stefani, E. "Kinetics properties of calcium channels of twitch muscle fibres of the frog." Journal of Physiology, 337:1-18, 1983.
- Schramm, M. Thomas, G., Towart, R. y Franckowiak, G. "Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca channels." Nature, 9:535-537, 1983.
- Schwartz, A. y Taira, N. "Symposium on calcium channel-blocking drugs: a novel intervention for the pretreatment of cardiac disease." Circulation Research, 52:1-181, 1983.
- Scott, R. H. y Dolphin, A.C. "Activation of a G protein promotes agonist responses to calcium channels ligands." Nature, 330:760-762, 1987.
- Seeman, P. Lee, T., Chau-Wong, M. y Wong, K. "Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors." Nature, 261:717-719, 1976.
- Seeman, P. Grigoriadis, D.E. y Niznik, H.B. "Selectivity of Agonists and Antagonists at D2 Dopamine Receptors Compared to D1 and S2 Receptors." Drug Development Research, 9:63-69, 1986.
- Seidl, E. "On the morphology of the vascular system of the catorid body of

REFERENCIAS

- cat and rabbit and its relation to the glomus Type I cells." En "The Peripheral Arterial Chemoreceptors", Ed. M.J. Purves, London., p. 293-299, 1975.
- Senogles, S. E., Benovic, J.L., Amlaiky, N., Unson, C., Milligan, G., Vinitzki, R., Spiegel, A.M. y Caron, M.G. "The D2-dopamine receptor of anterior pituitary is functionally associated with a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide binding protein." *The Journal of Biological Chemistry*, 262:4860-4867, 1987.
- Sunahara, R. K., Guan, H.G., O'Dowd, B.F., Seeman, P., Laurier, L., Ng, G., George, S.R., Torchia, J., Van Tol, H.M. y Niznik, H.B. "Cloning of the gene for a human dopamine D2 receptor with higher affinity for dopamine than D1." *Nature*, 350:614-619, 1991.
- Swandulla, D. Carbone, E. y Lux, H.D. "Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity?" *Trends in Neurosciences*, 14: 46-51, 1991.
- Swandulla, D. y Armstrong, C.M. "Fast-deactivating calcium channels in chick sensory neurons." *Journal of General Physiology*, 92:197-218, 1988.
- Tabares, L. Ureña, J. y López-Barneo, J. "Properties of calcium and potassium currents of clonal adrenocortical Cells." *Journal of General Physiology*, 93:495-519, 1989.
- Takahashi, M. Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F.X. y Catterall, W.A. "Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle." *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 84:5478-5482, 1987.
- Tanabe, T. Takeshima, H., Mikami, A. Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. y Numa, S. "Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle." *Nature*, 328: 313-318, 1987.
- Tang, C. M., Presser, F. y Morad, M. "Amiloride selectivity blocks the low-threshold (T) calcium channel." *Science*, 240:213-215, 1988.
- Trautwein, W. y Hescheler, J. "Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins." *Annual Review of Physiology*, 52:257-274, 1990.

REFERENCIAS

- Triggle, D. J. "Calcium channels ligands." *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, 27:347-369, 1987.
- Tsien, R. W. "Calcium channels in excitable cell membranes." *Annual Review of Physiology*, 45: 341-358, 1983.
- Tsien, R. W., Lipscombe, D., Madison, D.W., Bley, K.R. y Fox, A.P. "Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation." *Trends in Neurosciences*, 11:431-438, 1988.
- Tsunoo, A. Yoshi, M. y Narahashi, T. "Differential block of two calcium channels in neuroblastoma cells." *Biophysical Journal*, 47:433a (abstr.), 1985.
- Ureña, J. Mateos, J.C. y López-Barneo, J. "Low-cost system for automated acquisition, display and analysis of transmembrane ionic currents." *Medical & Biological Engineering & Computing*, 27:94-98, 1989a.
- Ureña, J. López-López, J., González, C., y López-Barneo, J. "Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body". *J. Gen. Physiol.* 93:979-999, 1989b.
- Van Tol, H. M., Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Niznik, H.B. y Civelli, O. "Cloning of the gene for a human dopamine D2 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine." *Nature*, 350:610-614, 1991.
- Vilven, J. y Coronado, R. "Opening of dihydropyridine calcium channels in skeletal muscle membranes by inositol triphosphate." *Nature*, 336:587-589, 1988.
- Watanabe, M. George, S.R. y Seeman, P. "Regulation of anterior pituitary D2 dopamine receptors by magnesium and sodium ions." *Journal of Neurochemistry*, 45:1842-1849, 1985.
- Yaari, T. Hamon, B, y Lux, H.D. "Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons." *Science*, 235: 680-682, 1987.
- Yatani, A. Codina, J., Imoto, Y., Reeves, J.P., Birnbaumer, L. y Brown, A.M. "A G protein regulates mammalian cardiac calcium channels." *Science*, 238:1288-1292, 1987.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Alberto Rodríguez Benot
Canales de calcio de las células glómicas
y su modulación por dopamina

acordó otorgarle la calificación de APTO CON LAUDE

Sevilla, 16 de Julio 1991

El Vocal,

[Signature]

El Presidente

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

Fco. Sala

El Doctorado,

[Signature]