



UNIDAD ASOCIADA NEURODEATH



**SELECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE
CANALES DE CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES EN LA
MUERTE CELULAR INDUCIDA POR VERATRIDINA EN
CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**

TESIS DOCTORAL

ANA VANESSA OCAÑA MARTÍNEZ

Directores de Tesis

Dr. Valentín Ceña Callejo

Dr. Francisco C. Pérez Martínez



UNIDAD ASOCIADA NEURODEATH



**SELECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE
CANALES DE CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES EN LA
MUERTE CELULAR INDUCIDA POR VERATRIDINA EN
CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**

Tesis Doctoral inscrita en el programa de Biomedicina Experimental del
Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla-La Mancha y
realizada en la Unidad Asociada Neurodeath UCLM-CSIC

Presentada por:

Ana Vanessa Ocaña Martínez

Directores de Tesis:

Dr. Valentín Ceña Callejo y Dr. Francisco C. Pérez Martínez

Albacete, febrero 2013



Valentín Ceña Callejo, Catedrático de Universidad del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla-La Mancha, y **Francisco Carlos Pérez Martínez**, Investigador Post-doctoral.

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral titulada “**SELECTIVIDAD DE LOS DIFERENTES SUBTIPOS DE CANALES DE CALCIO VOLTAJE-DEPENDIENTES EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR VERATRIDINA EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**” describe el trabajo de investigación llevado a cabo bajo nuestra dirección en la **Unidad Asociada Neurodeath** por Dña. **Ana Vanessa Ocaña Martínez**.

El trabajo supone una aportación inédita y relevante en el campo de la neurodegeneración, concretamente en el estudio de vías de entrada del calcio al interior celular ante estímulos excitotóxicos como el producido por elevadas concentraciones de veratridina. Consecuentemente, consideramos que esta Tesis Doctoral reúne los requisitos formales, científicos y metodológicos necesarios para ser defendida en la **Universidad de Castilla-La Mancha** como requisito para que Dña. **Ana Vanessa Ocaña Martínez** logre la obtención del título de Doctor.

Albacete, febrero de 2013

Dr. Valentín Ceña Callejo

Dr. Francisco C. Pérez Martínez

Directores de Tesis

Financiación

El trabajo llevado a cabo para realizar esta Tesis Doctoral ha sido financiado por los siguientes Proyectos de Investigación:

- PI081434 financiado por el ISCIII, y PI09-0163, financiado por la Consejería de Educación y Ciencia de la JCCM, de los cuales el investigador principal es el Dr. Valentín Ceña Callejo.

- PI09-0163, financiado por la Consejería de Educación y Ciencia de la JCCM cuyo investigador principal es el Dr. Valentín Ceña Callejo.

- BFU2011-30161-C02-01 financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, cuyo investigador principal es el Dr. Valentín Ceña Callejo.

Dña. **Ana Vanessa Ocaña Martínez** ha obtenido la Suficiencia Investigadora y el Diploma de Estudios Avanzados de Doctorado en el área de conocimiento de Farmacología, dentro del programa de doctorado de Biomedicina Experimental impartido en la Facultad de Medicina de Albacete y el Centro Regional de Investigaciones Científicas (CRIB) en el año 2011.

Dedicado a mi padre

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de las personas que me han acompañado, apoyado y levantado en los momentos difíciles. Por ello, no se cómo expresarles mi gratitud, porque mis palabras no expresarán todo mi agradecimiento.

Quiero agradecer a mis Directores de Tesis el haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, que tan apasionante ha sido para mí. A Valentín por su tiempo y por los ratos que hemos pasado poniendo a punto esas técnicas que tantos quebraderos de cabeza nos han dado. A Paco, qué decir, por su paciencia, por su ilusión y por creer en mí, porque sin su ayuda este trabajo no sólo no sería el que es, sino que no hubiera sido posible. A Inma, gracias por estar siempre aguantando mis interrupciones en su despacho, por su apoyo y por sus consejos.

No quiero olvidarme de mis compañeros de laboratorio, aunque en la etapa final sólo hayamos quedado *compañeras*, mi gratitud a Bea, Mari Carmen, Elena, Ana Belén, Vanessa, y aunque ya no estén trabajando aquí, a Raquel Poveda, Juan Raspeño, Pablo y Daniel. Además, aunque no hayan compartido laboratorio, quiero agradecer a la gente que me ha ayudado de una u otra forma, que me han aconsejado y han hecho posible que pasar tantas horas en la facultad fuera una tarea agradable.

Al personal del Instituto Max-Planck de Gottingen, que me acogieron y enseñaron tantas cosas, no sólo científicas: Joassia, Camilo, Vincenzo, Diana, Fernandinha, Alonso, Sünke, Aura, Victor, y mis directores en esa experiencia: Luis Pardo y Walter Stühmer. A todos mi agradecimiento.

A mi familia, por animarme en este proyecto, porque gracias a su apoyo, este camino ha sido mucho más fácil: a Rosa, mi madre, y a Paco, mi padre, que aunque no pueda verlo terminado, se que le haría mucha ilusión. A mi hermano, Francis, por estar siempre ahí, a Cristina, y a mis tíos Miguel y Anitere. Además, a Paqui, Manuel, Juan, Teresa, Luis, Anabel, y al abuelo, que también son mi

familia...y a mis preciosos sobrinos y sobrinas. A Paco, porque sin él, nada hubiera sido posible, simplemente, *te quiero*.

A mi abuela, por interesarse por mi trabajo, aunque no alcanzara a comprender ni la mitad de él, su cara de ilusión al escucharme: GRACIAS, allá donde estés.

Es imposible agradecer a todas las personas que me han acompañado en este trabajo, por ello, mis disculpas a los que no he mencionado, y que seguro que aportaron su granito de arena.

¡A todos, mil gracias!

SUMARIO

Las células cromafines son un modelo muy utilizado para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal. En este tipo celular, los canales de calcio voltaje-dependientes (CCVD) constituyen una de las principales vías de entrada de calcio (Ca^{2+}) a la célula en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática o a estímulos farmacológicos, siendo los CCVD de tipo L, N y P/Q los más abundantes en las células cromafines bovinas. En este sentido, resulta de gran importancia la búsqueda de nuevos antagonistas selectivos o moduladores de subtipos específicos de CCVD para el estudio y tratamiento en alguna de las diversas patologías en las que estos canales están involucrados. La transfección de material genético mediante nanopartículas (NPs) ha surgido como una buena alternativa para estudiar el papel que juegan los CCVD en diversas situaciones fisiológicas o patológicas.

En esta Tesis Doctoral, hemos estudiado una hipótesis novedosa como es el asignar una función específica al Ca^{2+} que entra en las células excitables a través de un tipo específico de CCVD. Para ello, hemos utilizado un nuevo vector no-viral para internalizar RNA pequeño de interferencia (siRNA) en el interior de las células cromafines bovinas. Para dilucidar el papel específico que desempeñan los CCVD en la toxicidad inducida por veratridina (VTD), hemos silenciado de forma selectiva genes que codifican la subunidad $\alpha 1$ de los CCVD: Cav1.1, Cav1.2 y Cav1.3 (tipo L), Cav2.2 (tipo N), Cav2.1 (tipo P/Q) y Cav2.3 (tipo R), y hemos estudiado los cambios en el patrón de toxicidad de VTD en células cromafines bovinas, evaluando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la actividad mitocondrial por ensayos de MTT, el aumento de la actividad caspasa 3 (apoptosis) y la muerte celular mediante ensayos de LDH.

En células cromafines bovinas en cultivo, la exposición a VTD (100 μM) induce, a través del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), la activación de varios mecanismos moleculares que conducen a la muerte

celular. En este sentido, nuestros resultados confirman que hay una relación directa entre la cantidad de Ca^{2+} que entra en las células mediante un determinado tipo de CCVD y el papel que desempeña en los procesos patológicos inducidos por VTD. La reducción de los niveles de RNA mensajero (RNAm) codificados por los genes Cav2.2 (CCVD tipo N) y Cav2.1 (CCVD tipo P/Q) mediante un vector no-viral (TRANSGEDEN[®]) parece inhibir de forma significativa la entrada de Ca^{2+} al interior celular, la producción de ROS, el deterioro bioquímico mitocondrial y la actividad caspasa 3, mostrando ser los que desempeñan un papel más relevante en la toxicidad inducida por VTD. Además, el silenciamiento de ambos genes de forma simultánea, reduce marcadamente la toxicidad producida por VTD. Por otro lado, los canales Cav1.2 y Cav1.3 (CCVD tipo L) muestran un papel menos relevante en la activación de la muerte celular inducida por VTD ya que, aunque su ausencia inhibió ciertos efectos tóxicos inducidos por VTD, no produjo cambios significativos en la muerte de las células cromafines bovinas.

Veritas filia temporis

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
1.- Las células cromafines de la médula adrenal como modelo biológico .1	
1.1.- Las glándulas adrenales	1
1.2.- Características de las células cromafines	3
1.3.- Excitabilidad de las células cromafines	4
1.4.- Acoplamiento excitación-secreción	8
1.4.1.- <i>Exocitosis en células cromafines</i>	10
2.- Canales iónicos en la célula cromafín	11
2.1.- Canales iónicos regulados por voltaje en la célula cromafín	11
2.1.1.- <i>Canales de Na⁺ activados por voltaje</i>	11
2.1.2.- <i>Canales de K⁺ activados por voltaje</i>	12
2.1.3.- <i>Canales de Ca²⁺ voltaje-dependientes (CCVD)</i>	13
2.2.- Modelo de excitotoxicidad inducido por <i>Veratridina</i>	21
2.3.- Canalopatías. Los CCVD como diana terapéutica	23
3.- Mecanismo de acción del RNA de interferencia (RNAi)	25
3.1.- Mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNAi.....	26
3.2.- Tipos de RNAi	27

4.- Nanopartículas	29
4.1.- Lípidos catiónicos	30
4.2.- Nanopartículas derivadas de Polietilenimina.....	31
4.3.- Dendrímeros.....	33
4.4.- Nanotubos con base de carbono.....	35
5.- Aplicaciones del silenciamiento génico utilizando siRNA	36
5.1.- Transfección de células post-mitóticas mediante vectores virales	37
5.2.- Transfección de células post-mitóticas mediante métodos físicos	38
5.3.- Transfección de células post-mitóticas mediante nanopartículas.....	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
1.- Hipótesis	45
2.- Objetivos	47
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1.- Cultivo primario de células cromafines bovinas	51
2.- Caracterización del cultivo de células cromafines por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	55
2.1.- Determinación de secreción de catecolaminas en células cromafines..	57
3.- Empleo de nanopartículas y siRNA en células cromafines bovinas	60
3.1.- Formación de los dendriplejos (dendrímero/siRNA).....	60
3.2.- Caracterización de la unión dendrímero/siRNA.....	60
3.2.1.- Retardo en gel de agarosa.....	62

3.2.2.- <i>Ensayos de desplazamiento con heparina</i>	63
3.2.3.- <i>Efecto protector del dendrímero sobre la degradación del siRNA por RNAsas</i>	64
3.3.- Estudio de la transfección y toxicidad del dendriplejo	64
3.4.- Estudio del silenciamiento génico mediante la reversotranscriptasa- reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time RT-PCR).....	67
3.4.1.- <i>Aislamiento de RNA total</i>	68
3.4.2.- <i>Síntesis de DNA copia (cDNA)</i>	70
4.- Modelo de muerte por VTD	71
4.1.- Estudios de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$	71
4.2.- Estudios de viabilidad celular	74
4.2.1.- <i>Estudio de células positivas a Ioduro de Propidio mediante citometría de flujo</i>	74
4.2.2.- <i>Reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT)</i>	75
4.2.3.- <i>Determinación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)</i>	76
4.3.- Producción de ROS.....	76
4.4.- Determinación de la actividad caspasa 3	77
5.- Análisis estadístico	78
RESULTADOS	79
1.- Caracterización del cultivo de células cromafines bovinas	81
2.- Caracterización de la interacción TGD/siRNA	83
2.1.- Formación y estabilidad del dendriplejo	83

2.2.- Protección del siRNA ante la degradación por RNAsas	85
2.3.- Captación y toxicidad de TGD en células cromafines bovinas	86
2.3.1.- Estudio de la captación de TGD por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.....	86
2.3.2.- Estudio de la toxicidad de TGD en células cromafines bovinas	88
2.4.- Producción de ROS.....	91
2.5.- Actividad caspasa 3 inducida por TGD	92
3.- Estudio del silenciamiento génico de diferentes subunidades $\alpha 1$ formadoras de los distintos tipos de CCVD por real time RT-PCR.....	93
4.- Caracterización del modelo de muerte por VTD en células cromafines bovinas.....	95
5.- Efecto de la inhibición selectiva de diversos CCVD sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por VTD	98
6.- Efecto de la inhibición selectiva de diversos CCVD sobre la producción de ROS y la actividad caspasa 3 inducida por VTD.....	100
7.- Efecto de la inhibición selectiva de CCVD sobre la toxicidad inducida por VTD	102
8.- Efecto de la inhibición selectiva simultánea de las subunidades $\alpha 1$ de los CCVD Cav2.1 y Cav2.2	103
8.1.- Estudio del silenciamiento génico mediante real time RT-PCR.....	104
8.2.- Efecto de la inhibición simultánea de las subunidades α de los CCVD Cav2.1 y Cav2.2 sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por VTD	105
8.3.- Efecto de la inhibición de las subunidades α de los CCVD Cav2.1 y Cav2.2 sobre la muerte celular inducida por VTD	107

DISCUSIÓN	109
1.- Caracterización del cultivo de células cromafines bovinas	112
1.1.- Características morfológicas de las células cromafines	112
1.2.- Actividad fisiológica de las células cromafines en cultivo	112
2.- Empleo del alcaloide VTD como modelo de muerte en células cromafines bovinas.....	114
2.1.- Características de las corrientes de Ca^{2+} generadas por VTD en células cromafines bovinas.....	114
2.2.- Estudio de los efectos tóxicos inducidos por VTD en células cromafines bovinas	116
2.2.1.- <i>Implicación del estrés oxidativo en la toxicidad inducida por VTD.....</i>	118
2.2.2.- <i>Disfunción mitocondrial en la toxicidad inducida por VTD.....</i>	119
2.2.3.- <i>Activación de la vía apoptótica inducida por VTD</i>	120
3.- TGD es un vector no-viral útil para transfectar células cromafines bovinas con siRNA sin producir toxicidad, y para silenciar la expresión de varias subunidades de CCVD.....	122
3.1.- Toxicidad de TGD en células cromafines bovinas.....	123
3.2.- Transfección de siRNA utilizando TGD como vector no viral	124
3.3.- Capacidad de interacción TGD/siRNA	126
3.4.- Uso de técnicas de RNAi para inhibir selectivamente los CCVD en células cromafines bovinas	127
4.- Papel que desempeñan cada uno de los CCVD en procesos de toxicidad inducidos por VTD, y su correlación con la $[Ca^{2+}]_i$.....	129

4.1.- Papel de los CCVD tipo L.....	132
4.2.- Papel de los CCVD tipo N.....	133
4.3.- Papel de los CCVD tipo P/Q.....	134
4.4.- Papel de los CCVD tipo R.....	136
4.5.- Papel combinado de los subtipos de CCVD Cav2.1 y Cav2.2	137
CONCLUSIONES.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	143

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina (del inglés <i>acetylcholine</i>)
AFC	Fluoróforo 7-amino-4-trifluorometil cumarina
BrEt	Bromuro de etidio
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumine</i>)
BZP	Benzotiazepinas
C	Control
CA	Catecolamina
Ca²⁺	Ión calcio
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
CCVD	Canal de calcio voltaje-dependiente
CM-H2DCFDA	5-(y-6-)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil éster
C_T	Ciclo umbral (del inglés <i>cycle threshold</i>)
DA	Dopamina
DBH	Enzima dopamina β-hidrolasa
DEVD	Secuencia aminoacídica de reconocimiento Aspártico-Glutámico-Valina-Aspártico
DHBA	Dihidroxibenzilamina
DHP	Dihidropiridinas
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Acido desoxirribonucleico
DOTMA	Cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi) propil)-N,N,N-trimetilamonio

DWNTs	Del inglés <i>Double-Walled Nanotubes</i>
FAA	Fenilalquilaminas
FAM-siRNA	Acido ribonucleico pequeño de interferencia marcado con fluoresceína
FBS	Suero fetal bovino
Fw	Sentido (del inglés <i>forward</i>)
G	Generación (en referencia a los dendrímeros)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HVA	Del inglés <i>High Voltage Activated</i>
IP	Ioduro de propidio
LDH	Lactato deshidrogenasa
L-DOPA	L-Dopamina
LVA	Del Inglés <i>Low Voltage Activated</i>
miRNA	microRNA
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
MWNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple. Del inglés <i>Multiple-Walled Nanotubes</i>
NP-HPLC	Cromatografía de fase normal
NP	Nanopartícula
PA	Potencial de acción
PAMAM	Starbust [®] poliamidoamina
PBS	Tampón fosfato-salino
PEI	Polietilenimina
piRNAs	RNA asociados a Piwi
PNMT	Enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa
poli-L	Poli-L-lisina

PPV	Polifenilenevinileno
PTP	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
Real time RT-PCR	Reversotranscriptasa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN (del inglés <i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA	Acido ribonucleico
RNAi	Acido ribonucleico de interferencia
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP-HPLC	Cromatografía de fase reversa
Rv	Antisentido (del inglés <i>reverse</i>)
sem	Error estándar de la media
siRNA	Acido ribonucleico pequeño de interferencia
SNC	Sistema nervioso central
SWNTs	Nanotubos de carbono de pared simple. Del inglés <i>Single-Walled Nanotubes</i>
TGD	TRANSGEDEN [®]
TH	Tirosina hidrolasa
TTX	Tetradotoxina
U.A.F.	Unidades arbitrarias de fluorescencia
UV	Luz ultravioleta
V	Vehículo
V_m	Potencial de membrana
V_r	Potencial de reposo
VTD	Veratridina

λ

Longitud de onda

INTRODUCCIÓN

1.- Las células cromafines de la médula adrenal como modelo biológico

1.1.- Las glándulas adrenales

Las glándulas adrenales (también llamadas glándulas suprarrenales) se encuentran localizadas encima de cada riñón y están divididas anatómicamente en corteza y médula. Ambas estructuras, a pesar de tener un origen filogenético diferente y funciones diversas, forman un órgano homogéneo (Fig. 1). Las glándulas adrenales están rodeadas por una gruesa capa de tejido conjuntivo denominada cápsula, que les da una forma de gorro frigio. La médula adrenal es la encargada de la producción de adrenalina y noradrenalina, mientras que la corteza se especializa en la secreción de tres tipos de hormonas:

- Mineralocorticoides (zona glomerular).
- Glucocorticoides (zona *fasciculata* y parte de la zona reticular).
- Andrógenos (zona *fasciculata* y zona reticular).

El origen embrionario de la corteza suprarrenal es el mesodermo, capa celular intermedia de las tres que forman el embrión en desarrollo, de la que derivan los huesos, el tejido conectivo, los músculos, la sangre, los tejidos linfático y vascular, la pleura, el pericardio y el peritoneo. Por otro lado, las células de la médula suprarrenal derivan embriológicamente de la cresta neural, un grupo de células que surgen de la región dorsal del tubo neural y que rápidamente se diferencian para dar lugar a los nervios simpáticos postganglionares, a las células cromafines de la médula adrenal, a las células de Schwann (células gliales periféricas que acompañan a las neuronas en su desarrollo y crecimiento, y recubren sus axones con una vaina aislante de mielina) e, incluso, a los melanocitos (células encargadas de producir melanina, un pigmento de la piel, ojos y pelo, cuya principal función es la de bloquear los rayos ultravioleta solares, evitando que dañen el DNA de las

células de estas regiones expuestas a la luz) (Fujita, 1977; Patterson, 1990). Es importante resaltar que ciertos factores humorales, como los glucocorticoides producidos por la corteza adrenal, determinan de manera específica el destino final de estas células embrionarias.

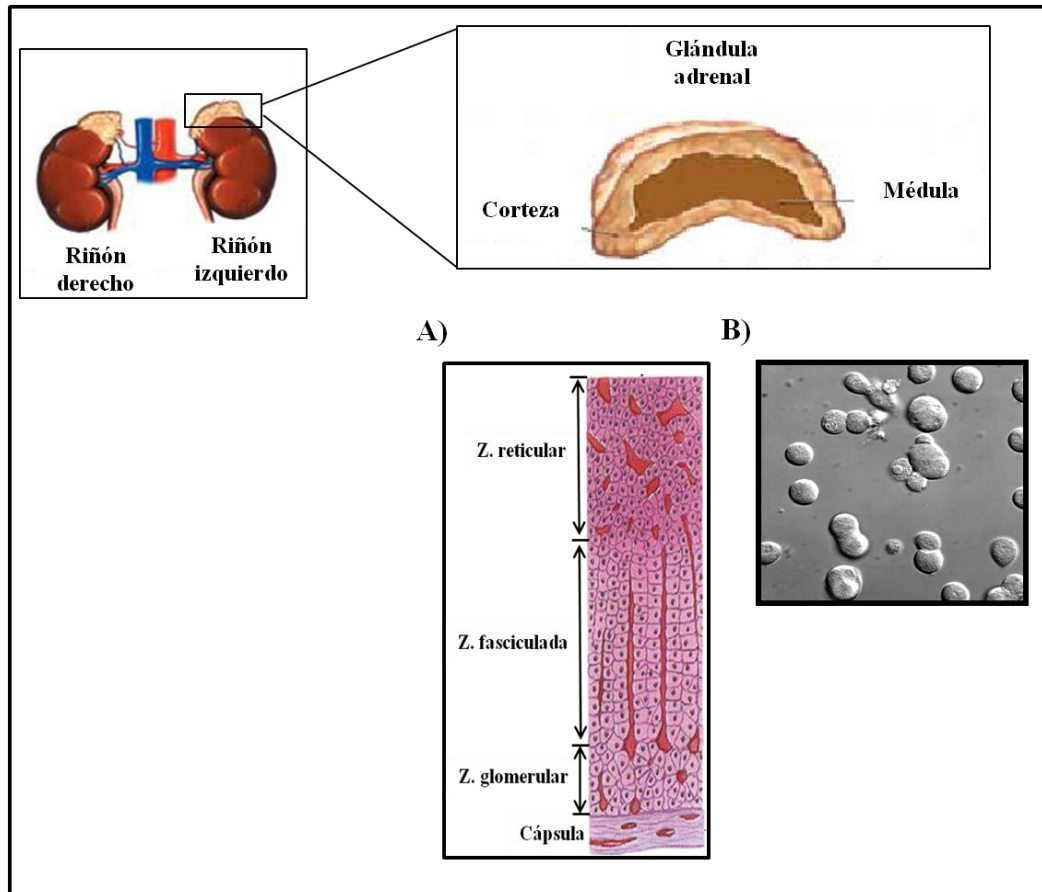


Figura 1.- Localización y estructura de la glándula adrenal. Esquema de la glándula adrenal donde se observa en posición más externa la corteza, y la médula en posición central, donde se ubican las células cromafines. A) Disposición de las células en tres zonas, que forman, en su conjunto, la corteza. B) Imagen de microscopía de campo claro de células cromafines de la médula adrenal en cultivo.

1.2.- Características de las células cromafines

Dentro de la médula adrenal, las células cromafines son poliédricas, exhiben una granulación muy fina y están distribuidas en cordones rodeados por redes capilares. A causa de su afinidad por las sales de cromo, las células con frecuencia reciben el nombre de células cromafines o feocrómicas. Durante el período final del desarrollo embrionario, los terminales nerviosos colinérgicos de neuronas preganglionares alcanzan la médula adrenal y establecen contactos sinápticos con las células cromafines como si de neuronas postganglionares se tratase (Fig. 2).

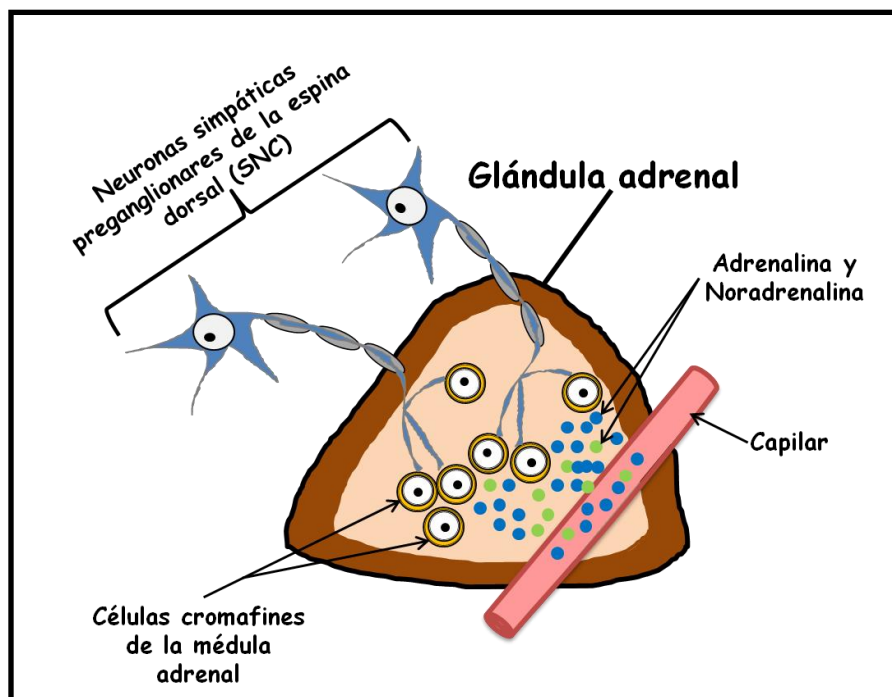


Figura 2.- Esquema representativo de la inervación de las células cromafines por las neuronas simpáticas procedentes del Sistema Nervioso Central (SNC). Las células cromafines se localizan en el interior de la médula adrenal, y sus productos de secreción, adrenalina y noradrenalina, son vertidos al torrente sanguíneo.

De hecho, la médula adrenal es un componente adicional del sistema nervioso simpático, y a las células cromafines se las considera paraneuronas

debido a su origen, a la secreción de catecolaminas (CAs) y a su excitabilidad, siendo capaces de generar potenciales de acción (Coupland, 1965a, b; Kobayashi, 1977). Con frecuencia se habla de la médula adrenal como un ganglio simpático modificado en el que las células postganglionares no emiten axones hacia los órganos diana, sino que vierten los neurotransmisores (neurohormonas) directamente al torrente sanguíneo.

1.3.- Excitabilidad de las células cromafines

En general, las células se pueden dividir, respecto a sus propiedades eléctricas, en dos tipos básicos: no excitables y excitables. Las células no excitables son aquellas que mantienen un potencial de membrana constante, o que varía muy poco. Por el contrario, las células excitables son aquellas, que en respuesta a determinadas señales pueden cambiar este potencial y originar un potencial de acción (PA). Entre estas últimas encontramos fundamentalmente tres tipos celulares en el reino animal: 1) las células musculares esqueléticas, que generan señales eléctricas que activan el mecanismo contráctil; 2) las células secretoras, entre las que se encuentran las células cromafines, que activan el mecanismo secretor por medio de señales eléctricas que producen a su vez, un aumento transitorio de la concentración intracelular del ión Ca^{2+} ; y 3) las neuronas.

La membrana celular está compuesta mayoritariamente por una bicapa de fosfolípidos altamente hidrofóbica, que impide el trasiego espontáneo de partículas cargadas como los iones, y establece la existencia de diferentes concentraciones de iones a ambos lados de la membrana. También contiene un gran número de moléculas proteicas insertadas en los lípidos, muchas de las cuales penetran en todo el grosor de la membrana, y que poseen unas propiedades totalmente diferentes para transportar sustancias.

La existencia de gradientes de concentración iónica a ambos lados de la membrana y las diferencias de la permeabilidad relativa de la membrana celular a las distintas especies iónicas presentes, genera una diferencia de potencial, que es más o menos constante para todas las células de un mismo

tipo, y que recibe el nombre de potencial de reposo, siendo el interior de la célula negativo con respecto al exterior.

Los PA son cambios rápidos del potencial de membrana. Cada PA comienza con un cambio súbito desde el potencial de membrana negativo en reposo normal hasta un potencial positivo, y después termina con un cambio, casi igual de rápido, de nuevo hacia el potencial negativo. Las fases del PA se dividen en las siguientes (Fig. 3):

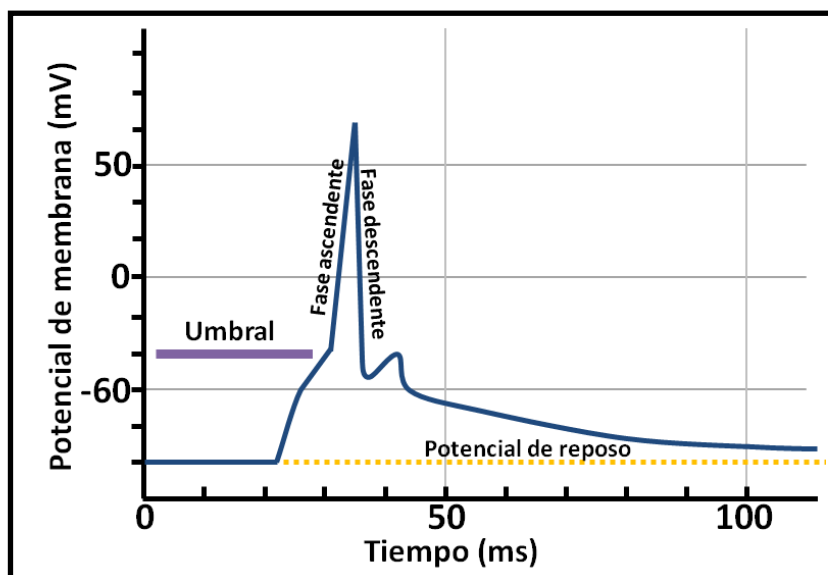


Figura 3.- Registro de un PA medido con técnicas electrofisiológicas.

-Fase de reposo: es el potencial de membrana de reposo antes del comienzo del potencial de acción.

-Fase de despolarización o ascendente: la membrana se hace súbitamente muy permeable a los iones sodio, por lo que estos iones con carga positiva entran en la célula. Como consecuencia, el potencial aumenta hacia más positivo, lo que se denomina despolarización.

-Fase de repolarización o descendente: en un plazo de algunas diezmilésimas de segundo, después de que la membrana se haya hecho muy

permeable a los iones sodio (Na^+), los canales de Na^+ comienzan a cerrarse, y los canales de potasio (K^+) se abren más de lo normal. Así, la rápida difusión de los iones K^+ hacia el exterior restablece el potencial de membrana de reposo (negativo), lo que se denomina repolarización de la membrana.

En la generación del potencial de acción, intervienen de forma principal los canales de Na^+ y K^+ activados por voltaje. Estos dos canales activados por voltaje tienen una función adicional a la de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y de los canales de fuga de K^+ .

En resumen, las células excitables son capaces de generar respuestas activas mediadas por aumentos de permeabilidad de canales iónicos voltaje-dependientes que se activan a ciertos valores del potencial de membrana, dependiendo del tipo celular (Guyton, 1988).

El potencial de membrana de las células cromafines en reposo se ha estimado que es de -50 mV (Artalejo y cols., 1995; Calvo y cols., 1995). En células cromafines, la actividad eléctrica está mediada por la entrada de Na^+ , que dispara potenciales de acción, y además, por la entrada de iones calcio (Ca^{2+}) al interior de las células, desencadenando la liberación de CAs (Tapia y cols., 2006). De este modo, los primeros estudios revelaron que el disparo de potenciales de acción continúa tras el bloqueo de las corrientes de Na^+ con tetrodotoxina (TTX), una potente neurotoxina que bloquea de forma específica los canales de Na^+ , o tras eliminar los iones Na^+ del medio extracelular, mostrando que los potenciales de acción en las células cromafines también son dependientes del Ca^{2+} (Kidokoro y cols., 1980; Brandt y cols., 1976).

Estos hallazgos fueron confirmados con estudios de las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} como prerrequisito para entender la función secretora de las células cromafines bovinas mediante la técnica de *patch-clamp* (Fenwick y cols., 1982a; Fenwick y cols., 1982b). Utilizando esta técnica, se describieron en células cromafines hasta 15 canales iónicos diferentes que contribuyen a las propiedades eléctricas de las células tanto en reposo como tras la estimulación mediante secretagogos (Artalejo y cols., 1995). En la Figura 4,

se resume el modelo de acoplamiento estímulo-secreción descrito para las células cromafines, en cuya respuesta participan los canales de Ca^{2+} voltaje-dependiente (CCVD) (García y cols., 2006).

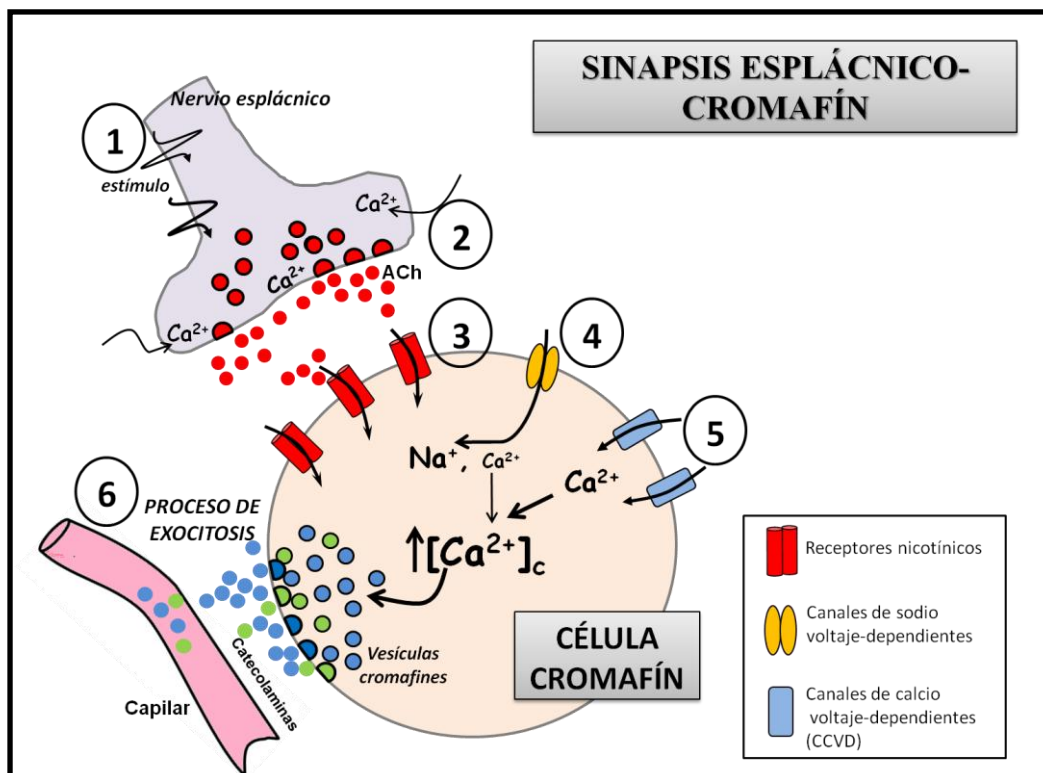


Figura 4.- Esquema de la sinapsis espláncnico-cromafín y de la secuencia de procesos que median la liberación de CAs. La llegada de un estímulo despolarizante al terminal del nervio espláncnico (1) produce la entrada de Ca^{2+} al terminal y la secreción de acetilcolina (ACh) (2). La ACh activa los receptores nicotínicos de la célula cromafín (3) produciendo la entrada de Na^+ y Ca^{2+} (en menor cantidad) a su interior (4). La entrada de Na^+ produce una leve despolarización, suficiente para activar los CCVD (5), y la entrada masiva de Ca^{2+} por estos canales desencadena finalmente la exocitosis de CAs (6).

1.4.- Acoplamiento excitación-secreción

Hace ya más de 50 años que Douglas y Rubin (1961) acuñaron la expresión “*acoplamiento excitación-secreción*” para resaltar la importancia de la entrada de Ca^{2+} extracelular en el desencadenamiento de la secreción de CAs en la célula cromafín de la glándula adrenal de gato.

Las glándulas adrenales participan en una de las respuestas fisiológicas más importantes para la supervivencia, la respuesta de “lucha o huída” descrita por el fisiólogo Walter B. Cannon en 1925. Esta respuesta es el resultado final de la secreción de CAs, que tiene lugar en la médula adrenal por parte de las células cromafines (Fig.4). La síntesis de CAs en las células cromafines constituye una compleja secuencia de reacciones químicas catalizadas por diferentes enzimas que se inicia en el aminoácido tirosina y termina en la producción de noradrenalina y adrenalina (Fig. 5). La primera etapa es catalizada por la enzima *tirosina hidrolasa* (TH) y resulta en la formación de L-3,4 dihidroxifenilalanina (también llamada levodopa o L-DOPA), a partir del aminoácido precursor L-Tirosina. La transformación de L-DOPA en dopamina es catalizada por la enzima *L-DOPA descarboxilasa*. La siguiente etapa implica la adición de un grupo hidroxilo al carbono β de la cadena lateral de dopamina para dar noradrenalina, y es catalizada por la enzima *dopamina β -hidrolasa* (DBH) (Ribeiro y cols., 1992; Kumer y Vrana, 1996).

Las células cromafines almacenan sus productos de secreción en organelas especiales: las vesículas secretoras. En células cromafines bovinas se han llegado a identificar hasta cinco tipos diferentes de estas vesículas, según su tamaño y forma al microscopio electrónico (Koval y cols., 2001).

En las células cromafines adrenérgicas, la cadena de reacciones enzimáticas termina con la metilación de la noradrenalina para dar adrenalina en una reacción catalizada por la *feniletanolamina N-metil transferasa* (PNMT). La reacción catalizada por la DBH tiene lugar en el interior de las vesículas de secreción, mientras que el resto de las reacciones enzimáticas

ocurren en el citoplasma de las células. Este hecho implica, en primer lugar, que la dopamina debe ser transportada al interior de los gránulos para su transformación en noradrenalina, y, en segundo lugar, que la noradrenalina, en células adrenérgicas, debe ser transportada al citoplasma donde se transforma en adrenalina, que se reintroduce de nuevo en el gránulo de secreción (Kilpatrick y cols., 1980; Livett y cols., 1984; Wilson y cols., 1987; Moro y cols., 1990).

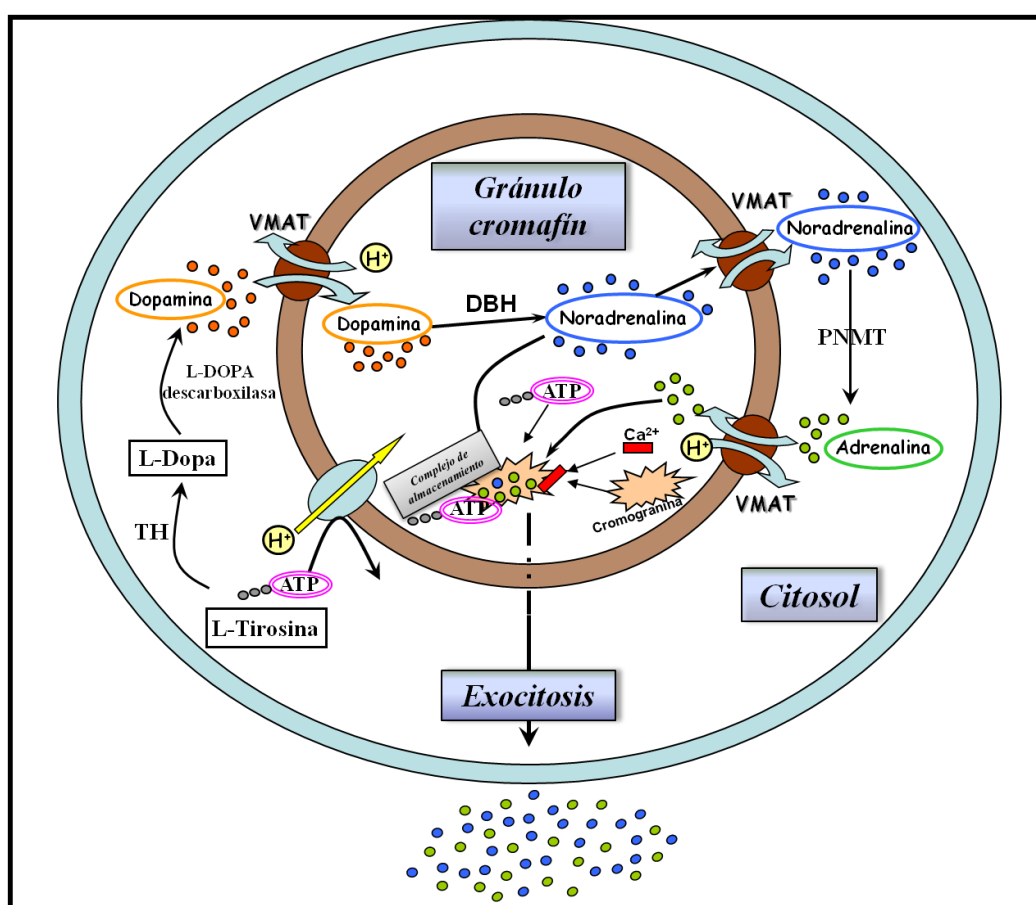


Figura 5.- Esquema de la biosíntesis de CAs. Las células cromafines sintetizan y almacenan adrenalina y noradrenalina, en una secuencia donde intervienen diferentes enzimas y transportadores: enzima tirosina hidrolasa (TH); enzima dopamina β-hidrolasa (DBH); enzima feniletanolamina N-metil transferasa (PNMT); transportador de vesículas monoaminas (VMAT).

1.4.1.- Exocitosis en células cromafines

La fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática ocurre en todas las células en la forma de exocitosis constitutiva, necesaria para reciclar la membrana plasmática y para secretar ciertas moléculas (anticuerpos, proteínas plasmáticas o componentes de la matriz extracelular). Pero en las células secretoras, entre ellas las neuronas y paraneuronas, se produce además la exocitosis regulada, que permite liberar de forma controlada ciertas moléculas en respuesta a una señal fisiológica.

La fusión de la membrana vesicular con la plasmática es una reacción que requiere de proteínas específicas que empujen a las membranas a mantenerse juntas, ya que la repulsión entre ambas membranas y el entorno acuoso no favorecería su fusión espontánea (Sudhof, 1995). Algunas de estas proteínas, muy conservadas en la evolución y en los diferentes tipos de neuronas y células neuroendocrinas, constituyen el denominado complejo SNARE (del inglés “*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*”), y se localizan o bien en la membrana de las vesículas secretoras (v-SNAREs) o bien en la membrana plasmática (t-SNAREs). Se han identificado principalmente de tres tipos (Sollner y cols., 1993; Roth y Burgoyne, 1994): proteína de membrana asociada a vesículas o sinaptobrevinas (VAMPs), sintaxinas y SNAP-25. Estas tres proteínas son suficientes para que se produzca el proceso de fusión *in vitro* (Weber y cols., 1998), pero *in vivo* son necesarias muchas otras proteínas reguladoras, como la α -SNAP (del inglés “*soluble NSF-attachment protein*”) o el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF). Este complejo entramado de proteínas constituye lo que ha dado en llamarse la “maquinaria de la exocitosis”.

2.- Canales iónicos en la célula cromafín

Los canales iónicos involucrados en la excitabilidad de las células cromafines han podido estudiarse gracias al desarrollo de las técnicas de *patch-clamp* y de biología molecular, y a la aparición de herramientas farmacológicas, fundamentalmente toxinas (procedentes de caracoles marinos, arañas, abejas, alacranes, serpientes, ranas, plantas, etc) o moléculas orgánicas de síntesis que son capaces de reconocer los diversos tipos de canales iónicos presentes en la membrana celular.

2.1.- Canales iónicos regulados por voltaje en la célula cromafín

En la superfamilia de canales dependientes de voltaje presentes en la célula cromafín se incluyen los canales de Na^+ , los de K^+ voltaje-dependientes, los de K^+ dependientes de Ca^{2+} y voltaje, y los CCVD.

2.1.1.- Canales de Na^+ activados por voltaje

Los canales de Na^+ son proteínas transmembrana que permiten el paso de iones Na^+ a través de la membrana celular. En la célula cromafín se comportan como amplificadores de la señal nicotínica, promoviendo una mayor despolarización de la membrana, que acabará reclutando a los CCVD. En el resto de situaciones, la despolarización producida por la activación de los receptores nicotínicos *per se* es capaz de reclutar CCVD, sin que sea necesaria la intervención de los canales de Na^+ . Probablemente éstos desempeñen también un papel en el acoplamiento eléctrico entre células cromafines, sincronizándolas para aunar la respuesta secretora.

Cuando el potencial de membrana en reposo se hace menos negativo que el de reposo, alcanzando valores entre -70 y -40 mV, se produce un cambio conformacional súbito en la activación de la compuerta, que bascula desde el estado inactivado hacia la posición abierta o estado activado, permitiendo que los iones Na^+ puedan atravesar el canal, aumentando así la permeabilidad de la membrana al sodio de 500 a 5000 veces (Guyton, 1988). El mismo

aumento de voltaje que abre la compuerta de activación también cierra la puerta de inactivación, pasando al estado cerrado. Sin embargo, la compuerta de inactivación se cierra más tarde de que se abra la de activación, es decir, el cambio que hace bascular la compuerta de inactivación hacia el estado cerrado es un proceso más lento que el que abre la compuerta de activación (Fig. 9). Además, en general, el canal de Na^+ , una vez cerrado, no se puede abrir de nuevo hasta que exista una repolarización.

2.1.2.- Canales de K^+ activados por voltaje

Los canales de K^+ descritos en la célula cromafín contribuyen a la hiperpolarización/repolarización de ésta durante los potenciales de acción, regulando su patrón de disparo y la exocitosis (González-García y cols., 1993; Lara y cols., 1995; Montiel y cols., 1995). Se han descrito principalmente dos tipos: el canal de K^+ rectificador retrasado, sensible a voltaje, y otro activado no sólo por voltaje sino principalmente por calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), los canales BK (de “*big conductance*”) (Marty, 1981).

Existe otro tipo, los canales SK (de “*small conductance*”), que en un principio se incluyeron en esta categoría, pero se ha observado que se activan casi exclusivamente por $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Adelman y cols., 2012), de manera que cuando el potencial de membrana está en reposo pero se producen elevaciones sostenidas del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son muy efectivos en hiperpolarizar a la célula. La estimulación muscarínica (y la consecuente liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares) es capaz de activar los canales de K^+ de tipo SK en la rata (Neely y Lingle, 1992), en el gato (Uceda y cols., 1994) o en bovino (Artalejo y cols., 1993), así como de inactivar los canales de K^+ de tipo BK en la rata (Neely y Lingle, 1992), afectando al patrón de disparo de potenciales de acción y a la respuesta secretora de las células cromafines.

2.1.3.- Canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (CCVD)

Los CCVD son estructuras proteicas complejas formadas por cuatro subunidades diferentes (α_1 , β , γ , $\alpha_2\delta$) de las que se requiere, al menos, tres de ellas para constituir un canal funcional (Fig. 6).

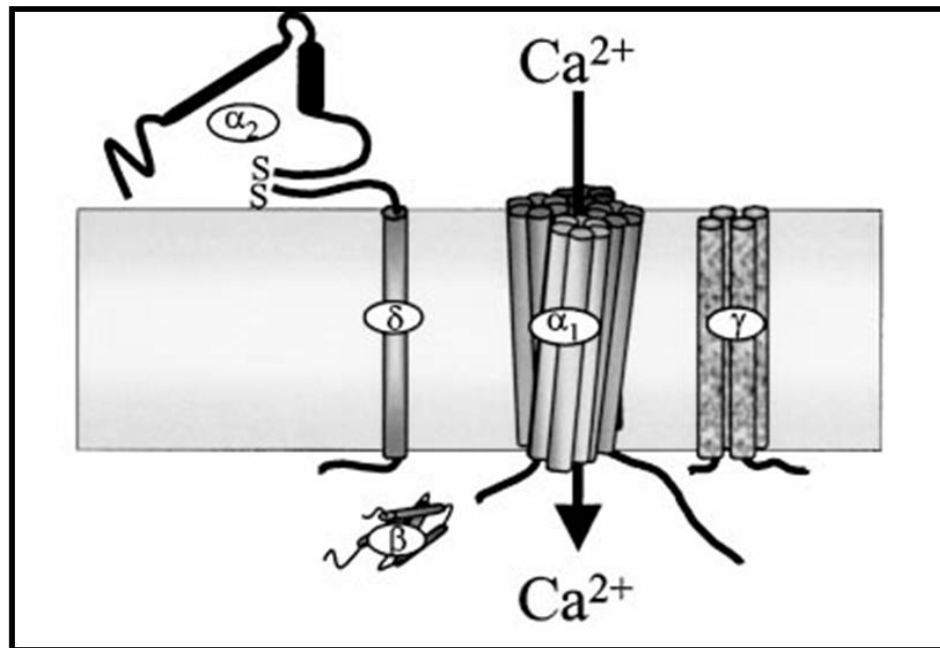


Figura 6.- Estructura esquemática de los CCVD (Adaptada de Zamponi, 2003).

La subunidad α_1 es la de mayor tamaño (170-250 kDa) y contiene el poro iónico, el sensor de voltaje, el mecanismo de compuerta y la mayoría de los sitios conocidos de regulación del canal por segundos mensajeros, fármacos y toxinas (Fig. 7). Esta subunidad está compuesta por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales incluye seis segmentos transmembrana (S1-S6) (Tanabe y cols., 1987; Lacinová, 2005). Las cargas positivas altamente conservadas del segmento S4 corresponderían al sensor de voltaje, mientras que el asa que une el segmento S5 y S6 formaría parte del poro iónico de selectividad del canal (García y cols., 1998). En los mamíferos, la subunidad α_1 está codificada por al menos 10 genes distintos y,

de hecho, la existencia de múltiples subunidades $\alpha 1$ es la causa de la diversidad farmacológica y electrofisiológica de los CCVD.

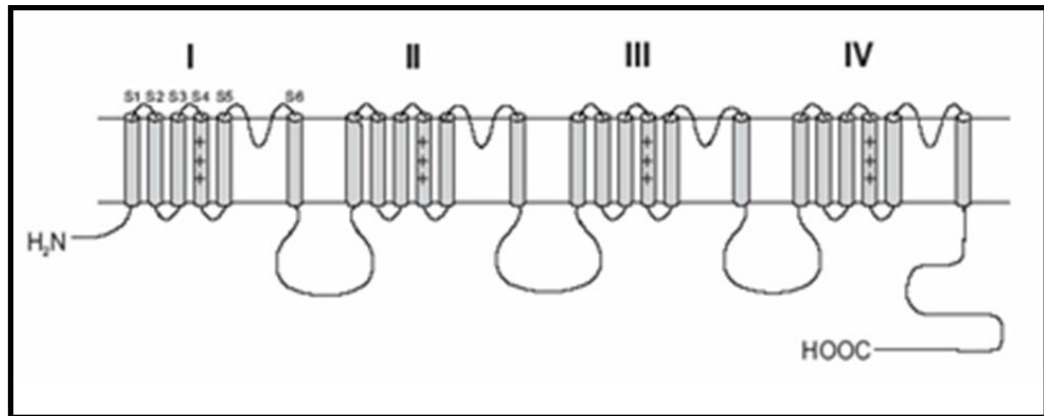


Figura 7.- Estructura molecular de la subunidad $\alpha 1$ de los CCVD, formada por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de ellos constituido por seis segmentos transmembrana (S1-S6) (Lacinová, 2005).

Del resto de subunidades de los CCVD, cabe destacar que: la subunidad β (1-4) es un componente intracelular esencial de los CCVD y posee un tamaño de entre 50 y 78 kDa. La expresión única de la subunidad $\alpha 1$ produce corrientes muy pequeñas, mientras que su coexpresión con la subunidad β aumenta en gran medida la amplitud de la corriente (Wess y cols., 2001).

En general, la coexpresión de las subunidades α y β provoca que la activación/inactivación dependiente de voltaje cambie hacia potenciales de membrana más negativos y que aumente la velocidad de inactivación (Hanlon y Wallace, 2002). La subunidad $\alpha 2\delta$ (1-4) tiene un papel modulador de los CCVD, es la segunda subunidad de mayor tamaño (unos 170 kDa) y, al igual que la subunidad β , modifica la interacción con inhibidores. Por último, la subunidad γ (1-8), la de menor tamaño (36 kDa), es una proteína integral de membrana que modula los CCVD e interacciona con otras proteínas de membrana (Lacinová, 2005).

Los CCVD presentan una amplia distribución, encontrándose presentes en la membrana plasmática de células nerviosas, musculares, cardíacas, endocrinas, células β -pancreáticas y células inmunológicas, entre otras. En la mayoría de estos tipos celulares, los CCVD constituyen una de las principales vías de entrada de Ca^{2+} a la célula en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática. Los cambios en la concentración del Ca^{2+} citosólico regulan una variedad de importantes funciones celulares como la neurotransmisión (Dunlap y cols., 1995), la contracción muscular y automatismo cardíaco (Beam y cols., 1989), la secreción hormonal (Ashcroft y cols., 1994; Calvo y cols., 1995), la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares (Fabiato y cols., 1983) y la expresión génica (Finkbeiner y Greenberg, 1998), así como la actividad de diversas enzimas.

Nomenclatura de los CCVD según sus propiedades biofísicas

La primera caracterización de corrientes de Ca^{2+} usando la técnica del patch-clamp en células cromafines bovinas fue realizada en 1982 (Fenwick y cols., 1982b). Posteriormente, de acuerdo a las propiedades biofísicas, los CCVD se englobaron en dos grandes grupos:

- CCVD de bajo umbral de activación o de tipo T (de corrientes transitorias). También se conocen como LVA, de las siglas *Low Voltage Activated*. Se abren a potenciales superiores a -50 mV, y están presentes en una gran variedad de tipos celulares, donde participan en la generación del PA y controlan los patrones de descargas repetitivas (Bean, 1985). Hasta el momento no se han encontrado inhibidores selectivos para estos canales, ya que los que existen también interaccionan con otros tipos de CCVD.
- CCVD de alto umbral de activación. También denominados HVA, de las siglas *High Voltage Activated*. Se abren a potenciales por encima de -30 mV, y son los principales responsables de la entrada de Ca^{2+} en neuronas y células cromafines. En este segundo grupo se han descrito hasta cuatro subtipos (L, N, P/Q y R), que están codificados por diferentes genes y que

se diferencian entre sí por sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Existen inhibidores o bloqueantes de estos tipos de canales como, por ejemplo, inhibidores orgánicos de los CCVD tipo L (moléculas orgánicas pequeñas), inhibidores de los CCVD tipo N (ω -conotoxina GVIA, aislada del veneno del caracol marino *Conus geographus*) o inhibidores de los CCVD tipo P/Q (ω -agatoxina IVA, proveniente del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*) (Olivera y cols., 1994; Catterall, 2000; Ertel y cols., 2000).

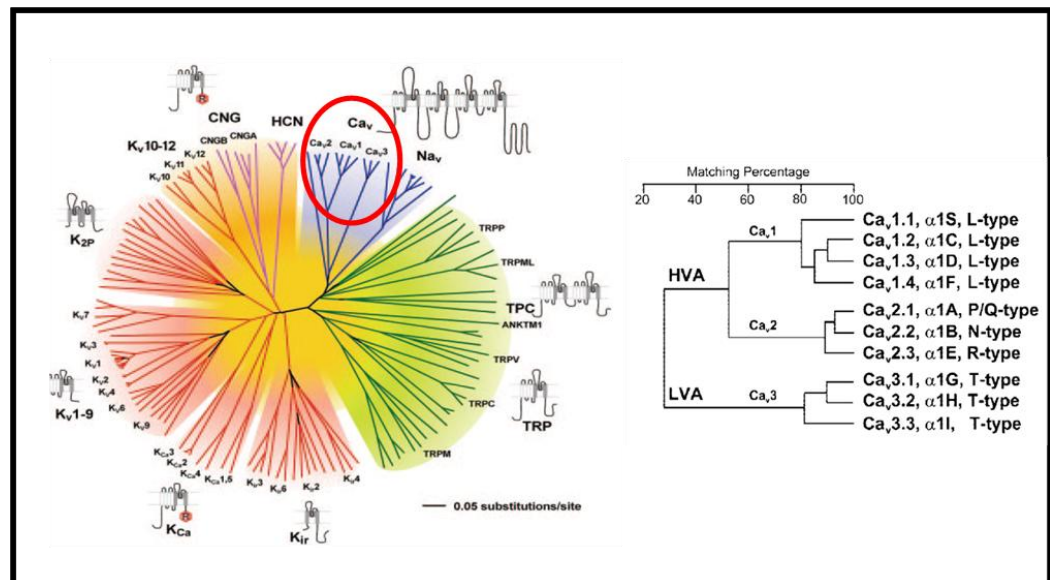


Figura 8.- Filogenia de los CCVD. Las subunidades $\alpha 1$ en mamíferos están codificadas por, al menos, diez genes distintos. Las secuencias de aminoácidos de las subunidades $\alpha 1$ dentro de una subfamilia son idénticas en más del 70%, estando más conservadas en los dominios transmembrana y en el poro (Catterall y cols., 2005).

Nomenclatura estructural actual de los CCVD

La nomenclatura actual, propuesta tras el clonaje de nuevos genes, ha agrupado a los CCVD en tres subfamilias (Fig. 8) nombradas de acuerdo al principal ión permeante (el Ca^{2+}), el principal regulador fisiológico (el voltaje,

V) y la subfamilia genética de la subunidad α_1 (1-3) (Ertel y cols., 2000; Catterall, 2000).

Superfamilia	Familia	Subunidad formadora	Nomenclatura	Bloqueantes específicos
CCVD de alto umbral de activación (HVA)	L	α_{1C}	Ca _v 1.2	Dihidropiridinas (DHP)
		α_{1D}	Ca _v 1.3	
		α_{1F}	Ca _v 1.4	
		α_{1S}	Ca _v 1.1	
	N	α_{1B}	Ca _v 2.2	ω -conotoxina GVIA
	P/Q	α_{1A}	Ca _v 2.1	ω -agatoxina IVA
	R	α_{1E}	Ca _v 2.3	SNX-482
CCVD de bajo umbral de activación (LVA)	T	α_{1G}	Ca _v 3.1	No se han descrito bloqueantes específicos
		α_{1H}	Ca _v 3.2	
		α_{1I}	Ca _v 3.3	

Tabla 1. Nomenclatura y farmacología de los CCVD. Se muestra la nomenclatura de las distintas subunidades α_1 junto con la farmacología descrita.

Siguiendo esta nomenclatura, la familia Cav1 (CCVD tipo L) está formada por 4 subtipos de canales denominados Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 y Cav1.4, según contengan las subunidades α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} o α_{1F} , respectivamente.

Por otro lado, la familia de receptores Cav2 media las corrientes de Ca^{2+} tipo P/Q, tipo N y tipo R, según posean la subunidad $\alpha 1A$ (Cav2.1), $\alpha 1B$ (Cav2.2) o $\alpha 1E$ (Cav2.3), respectivamente. Por último, la familia Cav3 (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3) incluye los canales que contienen las subunidades $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$, que median las corrientes de Ca^{2+} tipo T (Tabla 1).

Inhibidores farmacológicos de los CCVD

Los inhibidores farmacológicos conocidos actualmente tienen el inconveniente de no ser totalmente selectivos para el bloqueo de un único CCVD, ya que dependen de factores como la concentración utilizada (Bean y Mintz, 1994), del estado de despolarización de la célula (Sala y cols., 1986; Artalejo y cols., 1987; Ceña y cols., 1989), tiempo de exposición y el tipo celular, entre otros. Pueden clasificarse en tres grandes grupos (Doering y Zamponi, 2003, 2005):

- Iones inorgánicos. Los *iones inorgánicos* divalentes o trivalentes pueden actuar de dos formas: bloqueando físicamente el poro iónico de manera no selectiva, como el Cadmio, afectando a la mayoría de los subtipos de CCVD; o modificando la cinética de apertura y cierre del canal, como el Níquel (Nelson y cols., 1986; Atchison y cols., 2003). Es por su falta de selectividad, y por su conocida toxicidad, que estos iones no pueden ser usados en clínica.
- Péptidos. La acción de los *péptidos* (toxinas) provenientes de arañas, caracoles marinos o víboras, generalmente actúan de forma selectiva sobre algún subtipo de CCVD, y han servido de herramientas farmacológicas para la caracterización de varios de estos subtipos (Olivera y cols., 1994, 1997; Adams y cols., 2003). La acción de bloqueo puede producirse por oclusión física del poro del canal (*ω -conotoxina GVIA, MVIIA, MVIIC*) o por la modificación de la cinética de apertura y cierre del canal, como en el caso de la *ω -agatoxina IVA* (McDonough, 2007). Destacan dos tipos de toxinas especialmente útiles para el bloqueo de los CCVD:

- ✓ *Conotoxinas*. Esta familia de péptidos muestra una alta selectividad para los CCVD tipo N de ciertas especies y tejidos nerviosos (Williams y cols., 1992), causando un bloqueo irreversible a concentraciones nanomolares.
- ✓ *Agatoxinas*. Se han identificado cuatro subclases, tres de ellas (*ω-agatoxina II, III, y IV*) son capaces de inhibir los CCVD neuronales (Olivera y cols., 1994). La *ω-agatoxina IIIA* es capaz de inhibir distintos subtipos de CCVD, incluyendo el tipo L neuronal y cardiaco, canales tipo N y P/Q, pero no parece que inhiba a los de tipo T (Mintz y cols., 1991, 1994). Por el contrario, la *ω-agatoxina IVA* está considerada como un bloqueante específico de los canales P/Q, siendo hasta la fecha, la toxina conocida relativamente más selectiva.

Además, se han identificado otras toxinas capaces de bloquear los CCVD. Por ejemplo, el SNX-325 se conoce como un bloqueante selectivo del CCVD tipo N ($\alpha 1B$) clonado (Newcomb y cols., 1995a). A bajas concentraciones micromolares, la *ω-grammotoxina* (Lampe y cols., 1993a, b; Piser y cols., 1994, 1995; Turner y cols., 1995) bloquea de forma reversible los CCVD tipo N y P/Q. La *kurtoxina*, aislada de escorpiones, inhibe los CCVD tipo T (Chuang y cols., 1998), sin embargo, los tipo N y L también son parcialmente inhibidos (Sidach y Mintz, 2002), por lo que no son específicos. Los bloqueantes han sido muy utilizados como herramientas para la identificación y aislamiento de los subtipos de CCVD, y surgieron como un tratamiento potencial en enfermedades como el dolor crónico, pero su forma de administración, en muchos casos intratecal, supuso su abandono (Snutch, 2005).

- *Moléculas orgánicas*. Las *moléculas orgánicas* pequeñas son numerosas, y pueden tener efectos agonistas/antagonistas sobre subtipos de CCVD mediante la oclusión del poro, reduciendo el número de canales disponibles o modificando la cinética de apertura y cierre. Se ordenan atendiendo a su relación estructura/actividad (Doering y Zamponi, 2003) en:

- ✓ *Dihidropiridinas (DHP)*. Su estructura se basa en la piridina, e incluyen compuestos como *nifedipino*, *nimodipino*, *nitrendipino*, *isradipino* y *BAY K 8644*. Aunque están considerados como bloqueantes específicos de los CCVD tipo L, los canales tipo T muestran cierta sensibilidad a algunas DHPs (Akaike y cols., 1989; Romanin y cols., 1992; Santi y cols., 1996).

- ✓ *Fenilalquilaminas (FAA)*. Estructuralmente relacionadas con los anestésicos locales. Aunque se consideran preferencialmente inhibidores de los CCVD tipo L, también bloquean los canales tipo N y P/Q (Lee y Tsien, 1983; McDonald y cols., 1984; Hering y cols., 1989; Diochot y cols., 1995).

- ✓ *Benzotiazepinas (BZP)*. El receptor de BZP interactúa únicamente con agentes clínicos cuya estructura es similar al *diltiazem* y la *tetrandrina* (King y cols., 1988; Hering y cols., 1993). Se ha visto que la *tetrandrina* bloquea otros subtipos de CCVD neuronales, como el de tipo T (Weinsberg y cols., 1994), y el *diltiazem* bloquea los tipos L, P/Q y R con afinidad similar (Cai y cols., 1997).

Por otro lado, también se conocen otros tipos de moléculas orgánicas que actúan sobre los CCVD, como *amiloride*, que es conocido por su preferencia por los CCVD tipo T, aunque también interacciona con los de tipo L (Doering y Zamponi, 2003), y con otros canales iónicos, lo que limita su uso selectivo (Kaczorowski y cols., 1994). El compuesto natural *farnesol* (un intermediario en mamíferos de la vía del mevalonato) bloquea selectivamente los CCVD tipo N, entre los de HVA, con una afinidad en el rango nanomolar (Roullet y cols., 1999). Por último, el *mibefradilo* fue utilizado para el tratamiento de la hipertensión, isquemia y procesos del corazón como un bloqueante específico de los canales tipo T (Roux y cols., 1996; Vacher y cols., 1996; Ertel y cols., 1997; Mulder y cols., 1997, 1998), pero estudios más recientes han mostrado que también posee afinidad por otros CCVD (Bezprozvanny y Tsien, 1995; Viana y cols., 1997; Bernatchez y cols., 2001) y que, además, es capaz de

bloquear las corrientes de K^+ (Chouabe y cols., 2000; Perchenet y Clement-Chomienne, 2000).

Resulta de gran importancia comprender la acción de las moléculas orgánicas pequeñas sobre los CCVD tipo N que han emergido como una diana en el tratamiento del dolor (Doering. y Zamponi, 2005), así como la búsqueda de nuevos bloqueantes selectivos o moduladores de subtipos específicos de CCVD que puedan eventualmente ser utilizados como herramientas en alguna de las diversas patologías en las que estos canales están involucrados (Gandía y cols., 2007), ya que la especificidad de estos compuestos es relativa, dependiendo en muchos casos, de la concentración utilizada.

Los CCVD muestran características electrofisiológicas que se solapan entre sí, y sólo pudieron distinguirse por su farmacología: en general, los canales tipo L son muy sensibles a las DHPs; los de tipo N se definen porque sólo son sensibles a la ω -conotoxina GIVA; los tipos P/Q se identifican por su especificidad, pero con distinta sensibilidad, a la ω -agatoxina, y el tipo R se definió por su resistencia a estos antagonistas, pero identificaron péptidos bloqueantes específicos (Tottene y cols., 1996). No obstante, tal y como se ha indicado anteriormente, la selectividad de los bloqueantes sobre uno u otro subtipo de canal de Ca^{2+} no es absoluta.

2.2.- Modelo de excitotoxicidad inducido por *Veratridina*

En el modelo de excitotoxicidad utilizado en esta Tesis Doctoral se ha empleado ***Veratridina (VTD)***, un alcaloide derivado de esteroides de la familia *Liliaceae* que se obtiene principalmente de la hierba y semillas de la cebadilla *Veratrum*. La VTD actúa como una neurotoxina mediante la prevención de la inactivación de los canales iónicos de Na^+ , lo que provoca que estos canales permanezcan más tiempo en el estado abierto, sin pasar al estado inactivo, provocando una mayor despolarización de las células (Figs. 9 y 10).

Se ha demostrado que las neuronas tratadas con VTD muestran un aumento de la concentración intracelular de Na^+ y Ca^{2+} , que produce muerte dependiente de Ca^{2+} en neuronas del hipocampo y en células granulares del cerebelo de rata, lo que sugirió que los bloqueantes de los CCVD podrían ser útiles en el tratamiento de los accidentes cerebrovasculares (Pauwels y cols., 1989).

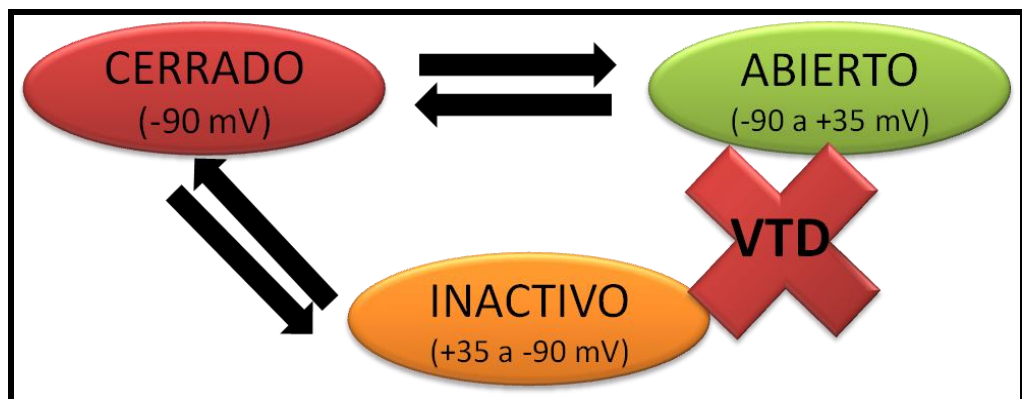


Figura 9.- Esquema de los estados del canal de Na^+ dependientes de voltaje.

La toxicidad inducida por VTD también se ha descrito en células cromafines por nuestro grupo (Jordán y cols., 2000, 2002, 2003). Este efecto despolarizante, manteniendo abiertos los canales de Na^+ voltaje-dependientes, provoca el incremento del flujo de Na^+ y Ca^{2+} , lo que induce la liberación de CAs en células cromafines y en otros tipos de células secretoras.

En células cromafines, la VTD activa la muerte celular programada mediante una serie de mecanismos secuenciales que incluyen un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, disfunción mitocondrial, apertura del poro de permeabilidad transitoria, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de la cascada de enzimas caspasas y la degradación del DNA (Jordán y cols., 2000). Las similitudes entre los mecanismos activados durante la muerte de las células cromafines y aquellos responsables de la muerte neuronal por

excitotoxicidad (Pettmann y Henderson, 1998) sugieren que las células cromafines son un modelo útil para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la muerte neuronal.

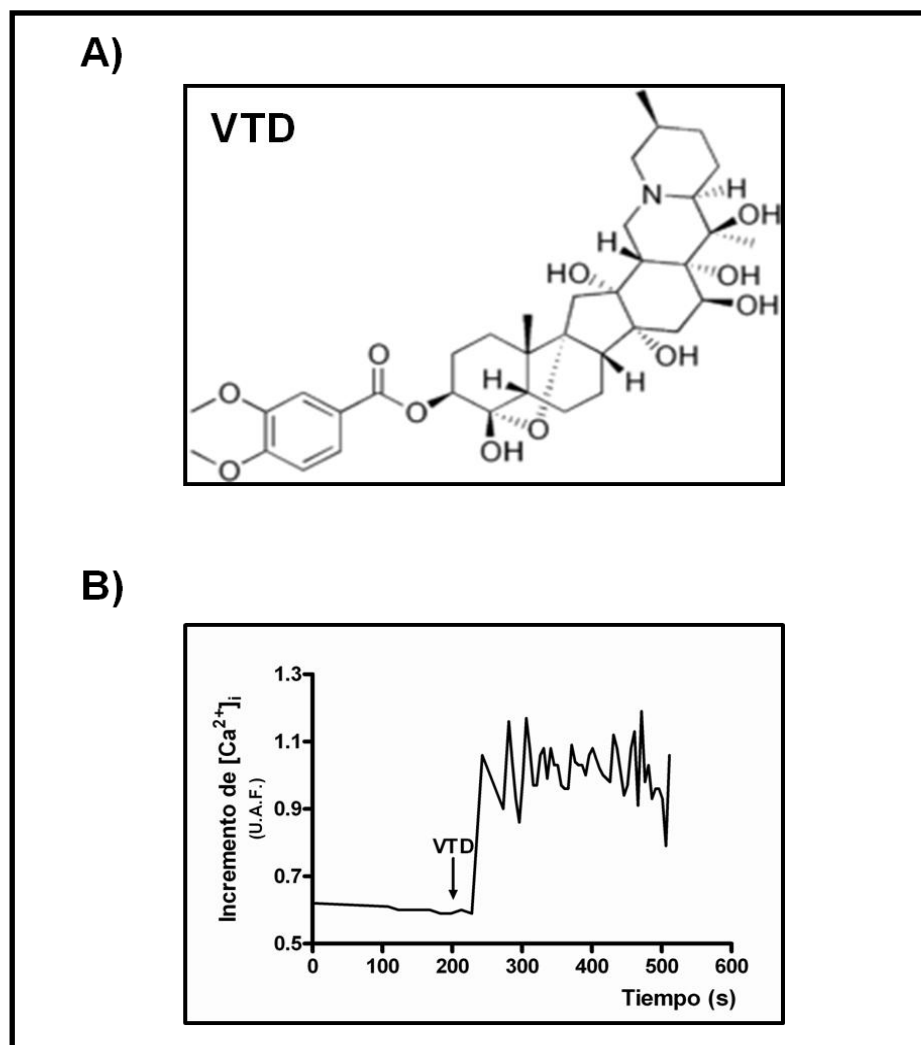


Figura 10.- A) Estructura química de la VTD; B) Patrón oscilatorio del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, expresada en unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.), en células cromafines, tras el tratamiento con VTD.

2.3.- Canalopatías. Los CCVD como diana terapéutica

En las dos últimas décadas hemos sido testigos de la emergencia de un nuevo campo en expansión de las enfermedades neurológicas, las canalopatías (Meisler y cols., 2001), relacionadas con la presencia de mutaciones en los genes que codifican las subunidades de los canales

iónicos. Estos desórdenes pueden afectar al cerebro, la espina dorsal, y/o el músculo (Rajakulendran y cols., 2012).

Hoy sabemos que las mutaciones de los canales de Na⁺, Ca²⁺, K⁺ y Cloro (Cl⁻) son responsables de cuadros de epilepsia, ataxia, degeneración neuronal, miotonía, hipertermia maligna, arritmias o hipoglucemia (Ackerman y Clapham, 1997; Lehman-Horn y Jurkat-Rot, 1999; Cooper y Jan, 1999; Catterall, 2000; Missiaen y cols., 2000; Hubner y Jentsch, 2002).

Los CCVD son una importante diana en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (Abernethy y Schwartz, 1999) mediante la utilización de compuestos bloqueadores, tradicionalmente llamados antagonistas del Ca²⁺. Sin embargo, el conocimiento de nuevas y múltiples isoformas de CCVD en distintos tejidos, así como el hallazgo de la implicación de los CCVD en patologías como la epilepsia (Jones y cols., 2002), el dolor crónico (McGivern y cols., 2006), el cáncer (Monteith y cols., 2007) y en las enfermedades neurodegenerativas (Kochegarov y cols., 2003), ha evidenciado aún más su importancia como diana terapéutica. La mayor parte de los inhibidores inorgánicos de CCVD son tóxicos. Es por ello y, principalmente, por su carácter inespecífico, por lo que estos inhibidores farmacológicos no han sido ampliamente utilizados como agentes terapéuticos (Livett y cols., 2004). Hasta el momento, las DHP han sido los antagonistas de CCVD más utilizados en clínica, y, por esta razón, también los más estudiados (Doering y Zamponi, 2005). En este sentido, resulta de gran importancia la búsqueda de nuevos antagonistas selectivos o moduladores de subtipos específicos de CCVD que puedan eventualmente ser utilizados como herramientas en alguna de las diversas patologías en las que estos canales están involucrados.

3.- Mecanismo de acción del RNA de interferencia (RNAi)

El RNAi es un sistema que utilizan las células para regular el grado de activación de los genes en un momento determinado. Concretamente, el RNAi es un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional de genes específicos, ejercido por moléculas de RNA que siendo complementarias a un RNA mensajero (RNAm), conducen habitualmente a la degradación de éste (Fig. 11). Por su descubrimiento Craig C. Mello y Andrew Fire recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2006.

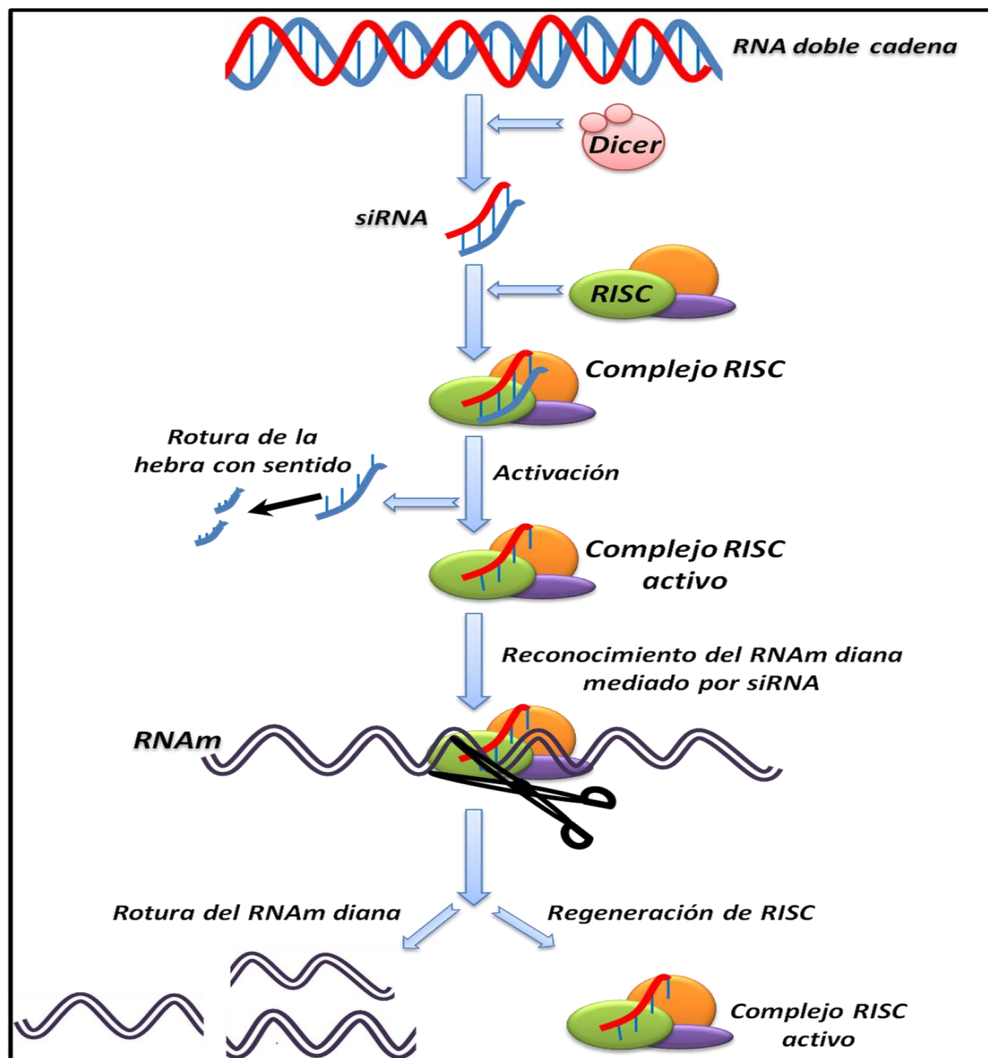


Figura 11.- Mecanismo de acción del RNAi. La enzima *Dicer* corta RNA bicatenario y genera pequeño RNA_i (siRNA) o *microRNA* (miRNA). Estos RNA pequeños se incorporan al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), activándolo y dirigiéndolo contra el RNAm complementario que será degradado.

3.1.- Mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNAi

Los RNAi son moléculas pequeñas (de 20 a 25 nucleótidos) que se generan por fragmentación de precursores más largos.

Cuando el RNAi se introduce en una célula, se activan distintos mecanismos que permiten su incorporación en un complejo con múltiples componentes, denominado *complejo de silenciamiento inducido por RNA* (RISC). El complejo RISC se activa mediante el desapareamiento de las dos hebras del siRNA. Aunque en principio se propuso que una enzima helicasa dependiente de ATP separaba ambas hebras, en realidad el proceso es independiente de ATP y se realiza directamente por proteínas que componen el complejo RISC (Matranga y cols., 2005; Leuschner y cols., 2006). Una vez separadas las dos hebras del siRNA, el complejo RISC utiliza la hebra antisentido del siRNA como guía para seleccionar su sustrato (el RNAm complementario de la hebra de siRNA). A continuación, el complejo RISC promueve el corte y posterior destrucción del RNAm diana, gracias a su componente activo, una proteína de la familia de las endonucleasas (denominadas *Argonautas*), que corta la hebra de RNAm diana, complementaria al RNAi que está asociado al complejo RISC (Nashchekin y cols., 2007). Finalmente, provoca la supresión de la expresión del gen específico (Hammond y cols., 2001; Caudy y cols., 2002) (Fig. 11). Una vez que el complejo RISC se activa, puede participar en ciclos repetidos de degradación específica del RNAm diana (Novina y Sharp, 2004). Por tanto, el RNAi suprime la expresión génica a nivel post-transcripcional (ya que la molécula diana es el RNAm), de manera selectiva y específica.

Los resultados de este tipo de supresión, pueden producir una reducción parcial (*knock-down*) o completa (*knock-out*) de los niveles de la proteína diana (Fig. 12). Utilizando este mecanismo, se puede conseguir una reducción drástica en la expresión del gen y la proteína deseada, y estudiar el papel que desempeñan en diferentes funciones fisiológicas (Harborth y cols., 2001).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que la supresión génica (también llamada *silenciamiento*) realizada por el RNAi suele ser específica, aunque pueden producirse efectos inespecíficos, denominados efectos *off-target*, en los que la expresión de otros genes puede verse también disminuida debido a similitudes en la secuencia de nucleótidos de distintos RNAm.

3.2.- Tipos de RNAi

Los RNAi se pueden clasificar en tres grandes grupos (Grosshans y Filipowicz, 2008a, b):

- Los RNA pequeños de interferencia o RNA de silenciamiento (siRNAs). Son moléculas de RNA de doble cadena perfectamente complementarias de aproximadamente 21 nucleótidos, con 2 nucleótidos desemparejados en cada extremo 3'. Cada hebra de RNA tiene un grupo fosfato en posición 5' y un grupo hidroxilo en 3'. Esta estructura proviene del procesamiento llevado a cabo por la enzima *Dicer*, que corta moléculas largas de RNA bicatenario en varios siRNAs (Hartig y cols., 2007). Son altamente específicos para la secuencia de nucleótidos de su RNAm diana, causando su degradación y el consiguiente silenciamiento post-transcripcional del gen específico.
- Los microRNAs (*miRNA*). Son pequeños RNAi de doble cadena que se generan a partir de precursores específicos codificados en el genoma, que al transcribirse se pliegan en horquillas intramoleculares (*hairpins*) que contienen segmentos de complementariedad imperfecta. El procesamiento de los precursores ocurre generalmente en dos etapas, catalizado por dos enzimas: *Drosha* en el núcleo y *Dicer* en el citoplasma. De este modo, una de las hebras del miRNA (la hebra "antisentido") se incorpora a un complejo y, dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el RNAm específico, puede inhibir la traducción del RNAm o inducir su degradación (Kim y cols., 2005; Eulalio, 2008).

- Los RNA asociados a Piwi (piRNAs). Se generan a partir de precursores largos monocatenarios, en un proceso que es independiente de las enzimas *Drosha* y *Dicer* (Saumet y Lecellier, 2006). Estos piRNAs se asocian con una subfamilia de las proteínas *Argonata* denominada proteínas *Piwi*. Se han identificado decenas de miles de piRNAs, pero su función es desconocida.

Los RNAi pueden ser también sintetizados artificialmente e introducidos de forma exógena en las células utilizando métodos de transfección con la finalidad de reducir significativamente la expresión de un gen específico.

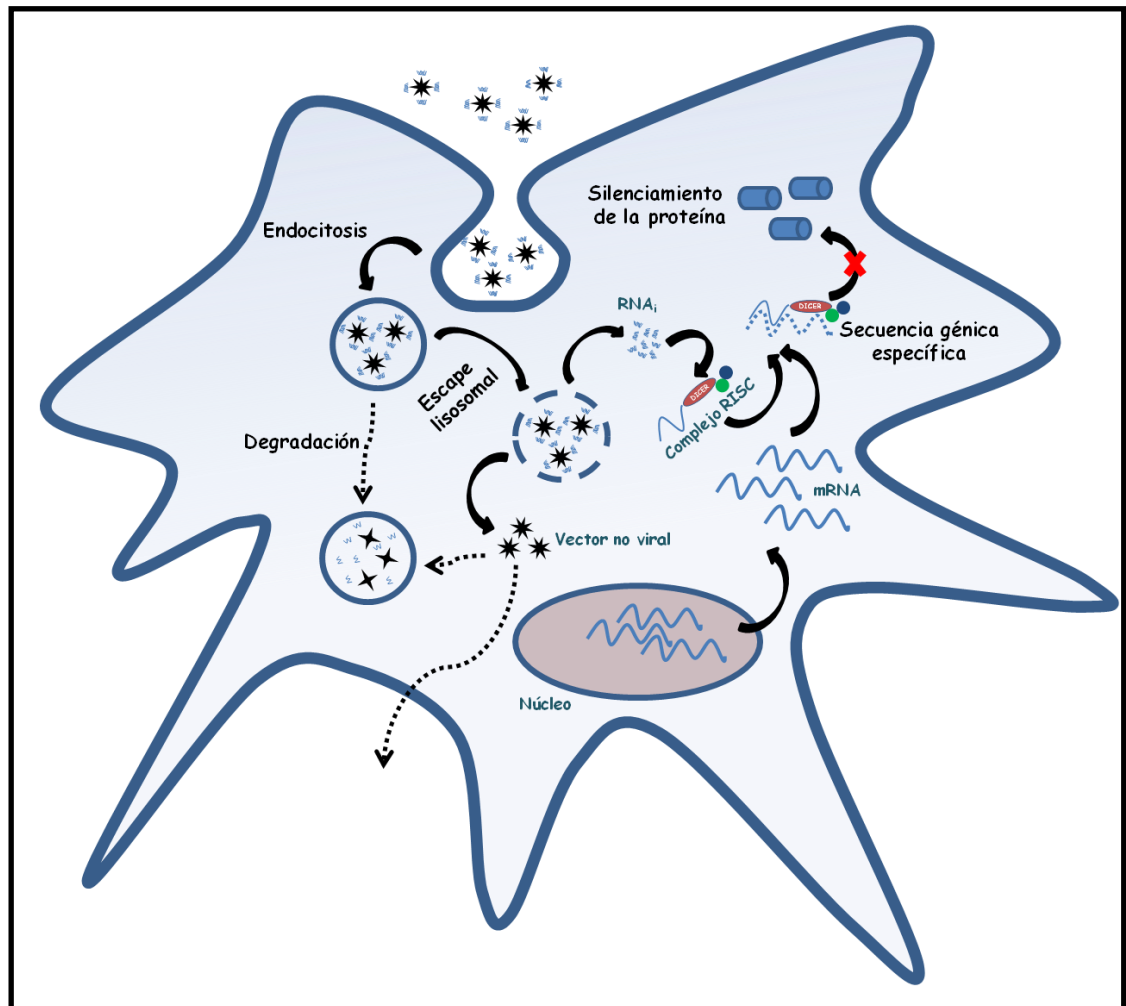


Figura 12.- *Mecanismo de silenciamiento génico mediado por siRNA exógeno, introducido en la célula por vectores no virales.*

4.- Nanopartículas

La existencia de un elevado número de patologías para las que no existen tratamientos eficaces, ha llevado a explorar nuevas áreas como la nanomedicina, una ciencia emergente basada en la aplicación de la nanotecnología a la medicina, con el objeto de buscar nuevos agentes terapéuticos que actúen de forma más selectiva sobre las dianas moleculares en las que ejercen su efecto.

Los principales vectores no-virales utilizados actualmente para transfectar material genético en diferentes tipos celulares son las nanopartículas (NPs), que son moléculas con tamaños entre 1 y 100 nm, que podemos clasificar en distintos grupos como: lípidos catiónicos, derivados de la polietiliminina (PEI), dendrímeros y NPs con base de carbono (Fig. 13) (Pérez-Martínez *et al.*, 2012a).

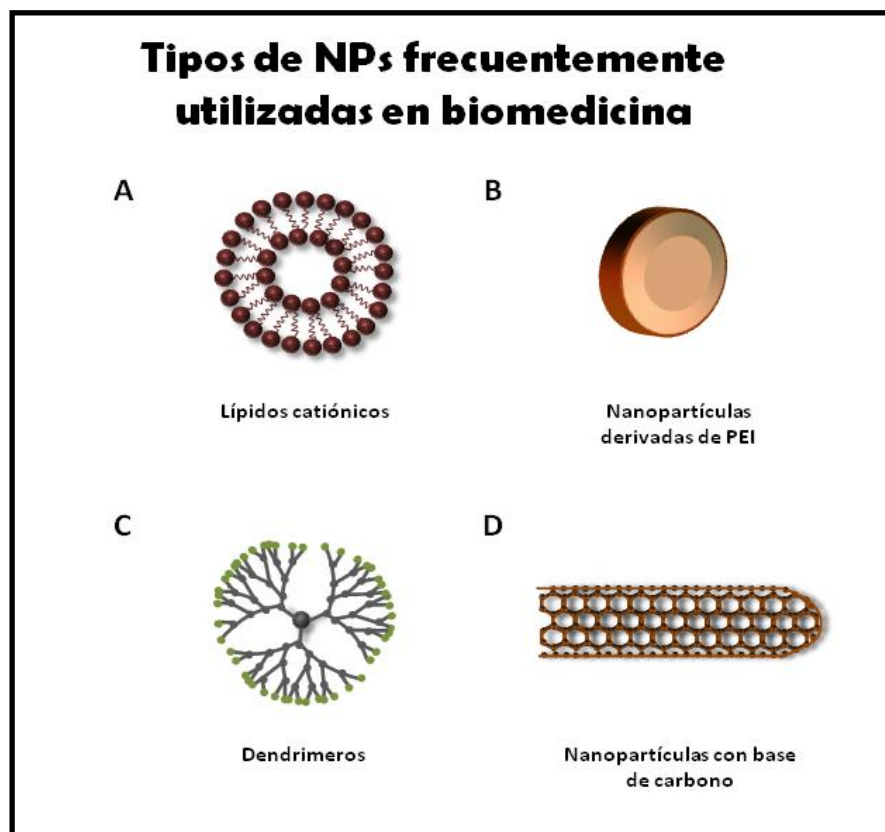


Figura 13.- Tipos de NPs frecuentemente utilizadas en biomedicina.

4.1.- Lípidos catiónicos

En 1987, Felgner y *cols.*, propusieron el término de "lipofección", refiriéndose a la eficiente transfección de DNA llevada a cabo a través del lípido catiónico sintético DOTMA [cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi) propil)-N,N,N-trimetilamonio], pues era de 5 a 10 veces mayor que la conseguida previamente con dextrano (Felgner y *cols.*, 1987). La combinación de DOTMA, un lípido anfifílico catiónico con dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), un fosfolípido neutral, fue comercializado como Lipofectin[®]. Posteriormente, la combinación de un derivado catiónico del colesterol (3 β -[N-(N'N'-dimetilaminoetano)-barbarmoil colesterol] [DC-Chol]) combinado con DOPE mejoró la eficiencia de transfección de Lipofectin[®] con menor toxicidad en las líneas celulares A431, A549 y L929 (Gao y *cols.*, 1991). Se utilizaron también en combinación con vectores retrovirales, aumentando la transducción en las células diana. Así, los retrovirus aumentaron hasta en 3,9 veces la eficiencia de transducción conseguida con DC-Chol/DOPE, manteniendo las propiedades del vector en las líneas celulares TE671 y NIH3T3 (Porter y *cols.*, 1998).

Los lípidos catiónicos fueron ampliamente estudiados como una nueva herramienta para transportar material genético y proteínas. De hecho, algunos reactivos basados en lípidos catiónicos están disponibles en forma comercial, como LipofectAce[®], Lipofectamine[®] o Lipofectamine2000[®].

En general, son tóxicos en células post-mitóticas, aunque distintas formulaciones lipídicas recientes han logrado disminuir esta toxicidad. Sin embargo, muestran una eficiencia de transfección del DNA muy baja en células post-mitóticas, por ejemplo, se ha observado una eficiencia de transfección con Lipofectin[®] del 0,02-0,5% en neuronas de hipocampo (Yang y *cols.*, 1994), entre un 1-5% en neuronas de estriado de rata con Transfectam[®] o un 2,4% en neuronas de glia con Fugene6[®] (Wiesenhofer y *cols.*, 2000).

Sin embargo, se ha descrito que la Lipofectamine[®] es capaz de introducir material genético en forma de siRNA, mediante el mecanismo de RNA_i, de forma eficiente en neuronas de hipocampo de rata, con una reducción de los niveles de RNAm diana de un 70% (Yan y cols., 2007). Además, se ha conseguido una reducción del RNAm diana del 70% (que corresponde a un 50% de reducción de los niveles de proteína en cultivos de neuronas corticales de ratón) utilizando la combinación de Transferrina con 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamonio) propano (DOTAP) y colesterol (Tf-DOTAP: colesterol) (Cardoso y cols., 2010). Por ello, los estudios se han orientado hacia las formulaciones de características similares a éstos últimos lípidos catiónicos, pues presentan propiedades que les hacen mucho más eficientes que los anteriores.

4.2.- Nanopartículas derivadas de Polietilenimina

La Polietilenimina (PEI) es un polímero orgánico con una elevada densidad de carga catiónica, debido a la presencia de múltiples grupos amino en su esqueleto, lo que permite la interacción electrostática con los ácidos nucleicos. Estas NPs las podemos encontrar en dos formas: lineal y ramificada, lo que le aporta diferentes características, siendo la ramificada la más eficiente en la interacción con los ácidos nucleicos (Dunlap y cols., 1997).

Su estructura le confiere la capacidad de actuar como tampón a, prácticamente cualquier pH, por lo que es capaz de proteger al DNA de la degradación lisosomal. Una vez que el complejo PEI/DNA escapa de la acción del endosoma, parece que entra en el núcleo por un mecanismo aún desconocido. Algunos autores defienden que la entrada al núcleo del complejo que forma el DNA con PEI lineal o ramificado, no es un mecanismo dependiente de la división celular (Bruner y cols., 2002), mientras que otros muestran que la eficiencia de transfección para los complejos de PEI ramificado con el DNA es dependiente del ciclo celular (Grosse y cols., 2006). Un mecanismo dependiente de mitosis podría explicar la baja eficiencia de transfección que se obtiene en cultivos primarios de neuronas, como en el

caso de neuronas granulares de cerebelo (1%) o en neuronas simpáticas de los ganglios superiores cervicales (20%).

Sin embargo, aunque se ha demostrado la existencia de un mecanismo dependiente de mitosis para las moléculas de PEI ramificadas, las mayores eficiencias de transfección se han conseguido utilizando derivados de las moléculas de PEI ramificadas de bajo peso molecular (Abdallah y *cols.*, 1996), lo que indica que, aunque el mecanismo principal de liberación en el núcleo es dependiente de mitosis, existen otros mecanismos, como el complejo del poro nuclear o mecanismos de captación neuronales, que también intervienen en la translocación del complejo al núcleo, por lo que la división celular no es un requisito indispensable para la transfección. Por ello, se han estudiado diversas estrategias para aumentar la eficiencia de transfección como la adición de secuencias de localización nuclear, de residuos glicosil o ligandos del receptor de glucocorticoides (Ma y *cols.*, 2009)

Estas NPs poseen, en general, una mayor eficiencia de transfección que los lípidos catiónicos (Guerra-Crespo y *cols.*, 2003) en células post-mitóticas (aproximadamente de un 20%), pero no es suficiente para estudios que requieren “ausencia de función” de un gen específico (se requiere como mínimo el 70-80% de silenciamiento). Por otro lado, aunque se han realizado modificaciones para disminuir su toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo* (Moreno y *cols.*, 2006), continúan siendo poco útiles en aplicaciones biomédicas.

4.3.- Dendrímeros

Son NPs ramificadas, con una estructura bien definida (Fig. 14), formada por tres dominios:

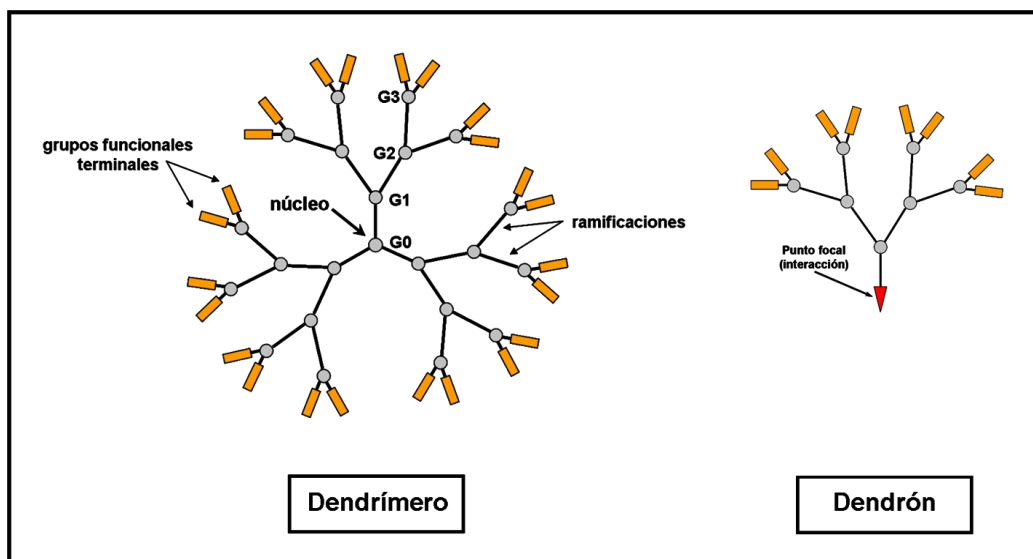


Figura 14.- Estructura de un dendrímero. Se muestran los dominios que constituyen la NP, representando las distintas generaciones (G).

- Un *núcleo central*, que está formado por uno o un grupo de átomos con, al menos, dos funcionalidades químicas que facilitan la inserción de las ramificaciones.
- Las “*ramificaciones*”, compuestas por unidades repetitivas, organizadas en una progresión geométrica, que forman una serie de capas radiales concéntricas denominadas “generación” (G).
- Los *grupos funcionales terminales*, localizados en el exterior de la macromolécula, y que poseen una función determinante en su interacción con solventes, superficies u otras moléculas.

Starbust[®] poliamidoamina (PAMAM) fue el primer dendrímero descrito para aplicaciones biológicas, y ha sido, hasta la fecha, el más estudiado (Pérez-Martínez y *cols.*, 2012c) como vehículo de transfección (Tomalia y *cols.*, 1996; Pérez-Martínez y *cols.*, 2011). Muestra una toxicidad dependiente de la generación, que está directamente relacionada con el número de grupos amino terminales y la densidad de cargas positivas.

El transporte de los dendrímeros PAMAM y sus derivados a través de la membrana celular se produce mediante la vía endocítica (Jevprasesphant y *cols.*, 2004). Diversos factores, como la masa molecular del dendrímero, los grupos funcionales de la periferia (Kannan y *cols.*, 2004) y niveles de colesterol, son responsables de modular su transporte, lo que sugiere que el colesterol de la membrana y su integridad son factores relevantes para la captación celular de los complejos formados por el dendrímero y el *cargo* (dendriplejos) (Manunta y *cols.*, 2004). Los dendrímeros han mostrado ser capaces de atravesar las barreras celulares, actuando de forma eficiente como transportadores de moléculas, incluyendo ácidos nucleicos. Se ha observado un aumento en la transfección cuando se modifica la estructura del PAMAM con grupos menos polares, como polietilenglicol (PEG), en la periferia, o cuando se combina la adición de PEG junto a otro ligando con elevada afinidad por determinadas células neuronales como la lactoferrina. Además, también permite la unión de proteínas o péptidos, facilitando su captación por las células diana (Huang y *cols.*, 2008).

En los últimos años, se han descrito varios tipos de dendrímeros capaces de transfectar cultivos neuronales eficientemente, como dendrímeros carbosilanos (Weber y *cols.*, 2008; Posadas y *cols.*, 2009), dendrímeros basados en poliglicerol (Ofek y *cols.*, 2010) o dendrímeros con núcleo de polifenilenevinileno (PPV) (Rodrigo y *cols.*, 2011; Posadas y *cols.*, 2012; Pérez-Carrión y *cols.*, 2012), como el utilizado en esta Tesis Doctoral. Por este motivo, los dendrímeros parecen ser herramientas prometedoras para liberar material genético en células del sistema nervioso, tanto *in vitro* como *in vivo* (Posadas y *cols.*, 2010).

4.4.- Nanotubos con base de carbono

Consisten en una capa de grafeno enrollada concéntricamente formando cilindros huecos compuestos en su mayoría por hexágonos y, en los extremos, por pentágonos de carbono. El número de capas de grafeno diferencia entre los nanotubos con base de carbono (CNT) formados por una única capa (SWNTs: Single-Walled Nanotubes), por dos (DWNTs: Double-Walled Nanotubes) o por múltiples capas (MWNTs: Multiple-Walled Nanotubes). Su tamaño varía desde un diámetro de cilindro de 0,8 nm, de los formados por una capa, a diámetros superiores a 100 nm, de los que poseen múltiples capas.

Estas NPs muestran una baja solubilidad, que puede solventarse por la incorporación de diversas unidades (funcionalizaciones). Se han unido dendrímeros de PAMAM a la superficie de los nanotubos, lo que se traduce en un aumento de la transfección (Herrero y *cols.*, 2009). La segunda cuestión por resolver para su posible uso en terapia génica es su posible efecto tóxico. Los CNTs están formados principalmente por grafeno, por lo que podrían ser biopersistentes, es decir, no se pueden eliminar, permaneciendo por mucho tiempo en el organismo, principalmente en los pulmones. Se ha observado que la aplicación de forma intratecal o mediante inhalación faríngea de una suspensión de SWCNT en ratón provoca una acumulación persistente de agregados de CNT en pulmones, seguido de una rápida formación de granulomas pulmonares y tejido fibrótico (Shvedova y *cols.*, 2005); reacciones inflamatorias de los bronquiolos y, en algunos animales, fibrosis en el septo alveolar (Huczko y *cols.*, 2005).

Son estructuras novedosas que escapan de los endosomas, pero que requieren aún mejorar su funcionalización (Pantarotto y *cols.*, 2004; Lacerda y *cols.*, 2008; Bianco y *cols.*, 2008) para aumentar su solubilidad (Chen y *cols.*, 2003) y disminuir su toxicidad.

5.- Aplicaciones del silenciamiento génico utilizando siRNA

La especificidad y la robustez del efecto del siRNA sobre la expresión génica, hacen de este mecanismo una valiosa herramienta en investigación, tanto en cultivos celulares como en estudios *in vivo*, ya que los siRNAs sintéticos pueden introducirse en las células para inducir el silenciamiento selectivo de genes de interés. Esto ha permitido un avance espectacular en el desarrollo de la biología celular, ya que el siRNA es una herramienta simple y rápida para el estudio de la función de los genes. Los siRNAs también pueden utilizarse para silenciar sistemáticamente diversos genes de la célula (análisis genómico). Para ello, se sintetiza el siRNA con una secuencia complementaria a la del gen de interés y se introduce en una célula u organismo, consiguiendo silenciar el RNAm diana, pudiendo estudiar el papel que desempeñan determinados genes en los procesos celulares de interés.

Actualmente, se están desarrollando ensayos clínicos para el uso de siRNA en el tratamiento de enfermedades como, por ejemplo, la degeneración macular (Sah y *cols.*, 2006). Otros usos clínicos propuestos se centran en terapias antivirales, incluyendo el silenciamiento de los receptores y correceptores del virus de inmunodeficiencia adquirida en humanos (VIH) en el huésped (Crowe y *cols.*, 2003), el silenciamiento del virus de la hepatitis A (Kusov y *cols.*, 2006) y de la hepatitis B (Jia y *cols.*, 2006), el silenciamiento de la expresión del virus de la gripe (Li y *cols.*, 2005), y la inhibición de la replicación del virus del sarampión (Hu y *cols.*, 2005). También se han propuesto tratamientos potenciales para enfermedades neurodegenerativas (Posadas y *cols.*, 2012; Pérez-Carrión y *cols.*, 2012), prestando una atención particular a las enfermedades relacionadas con poliglutaminas entre las que destaca la enfermedad de Huntington (Raoul y *cols.*, 2006). Por último, el siRNA también se considera una alternativa prometedora para tratar el cáncer, mediante el silenciamiento diferencial de genes sobreexpresados en células tumorales o genes involucrados en la división celular (Izquierdo y *cols.*, 2005; Putral y Gu, 2006; McMillan y *cols.*, 2006; Monteagudo y *cols.*, 2012; Pérez-Martínez y *cols.*, 2012b).

Un área clave de investigación en el uso de siRNA en aplicaciones biomédicas, es el desarrollo de métodos útiles para transportar el material genético al interior de las células (evitando su degradación) similares a los que se utilizan en terapia génica (Li y cols., 2006; Takeshita y Ochiya, 2006). Los problemas que aparecen al trabajar con siRNA están relacionados con su degradabilidad, ya que son fácilmente destruidos en el entorno intracelular debido a la existencia de RNAsas, lo que puede impedir que una vez dentro de la célula sea capaz de trasladarse al núcleo y ejercer su efecto de silenciamiento en el gen diana. En este sentido, cabe destacar el auge del uso de NPs para transportar el siRNA al interior de aquellas células más difíciles de transfectar. A continuación, se describen los grandes grupos de vectores utilizados para introducir siRNA en el interior celular.

5.1.- Transfección de células post-mitóticas mediante vectores virales

En células post-mitóticas, como neuronas o células cromafines, debido a la baja eficiencia de transfección de los vectores no-virales clásicos, la estrategia utilizada para el transporte del material genético al interior celular se ha realizado mediante el empleo de vectores virales. Con este tipo de vectores se ha conseguido una alta eficiencia de transfección del siRNA en células post-mitóticas, logrando aproximadamente un 80% de inhibición de la expresión de la proteína, lo que se considera suficiente para realizar los estudios de “ausencia de función”. No obstante, los vectores virales poseen inconvenientes específicos, como son:

- Un elevado coste de producción.
- Activación de la respuesta inmune en el hospedador contra el agente vírico. Generalmente se caracteriza por una respuesta humoral que produce anticuerpos neutralizantes, disminuyendo la efectividad del vector. Por otro lado, también se ha descrito presencia de anticuerpos neutralizantes contra vectores virales, a causa de una infección anterior, como en el caso de los adenovirus (Chirmule y cols., 2000).

- Problemas de seguridad, en particular, en el uso de *oncoretrovirus*, como ocurre cuando existe mutagénesis por inserción durante los ensayos de terapia génica. Este tipo de inconvenientes ha supuesto una enorme limitación del uso de estos vectores, ya que se han dado casos de muerte de varios pacientes que participaban en ensayos clínicos de terapia génica utilizando vectores virales (Lemoine, 2002; Hacein-Bey-Abina y cols., 2003; Gansbacher, 2003).

5.2.- Transfección de células post-mitóticas mediante métodos físicos

Los vectores no virales engloban aquellas técnicas donde el material genético es introducido mediante diferentes métodos, entre ellos, los físicos. Estos últimos engloban los métodos de biobalística, electroporación, y microinyección.

- Disparo de partículas, biolística o bombardeo de microproyectiles. El material genético (normalmente DNA) a transferir es situado sobre la superficie de pequeñas gotas de 1-3 micras de diámetro de oro o tungsteno que posteriormente son aceleradas (“disparadas”) mediante una descarga eléctrica o por un pulso de gas, hacia la célula diana. El problema es que aparecen grandes variaciones en la eficiencia de la expresión de los genes, ya que la expresión conseguida suele ser transitoria y con una frecuencia baja. Este hecho limita la biobalística en la aplicación de la terapia génica (Tüting y cols., 1999).
- Microinyección. El material genético (DNA normalmente) es introducido por inyección directamente en el núcleo de las células gracias a la ayuda de un micromanipulador, evitando de este modo la degradación citoplasmática y lisosomal. Las células que sobreviven a este daño y han insertado el material genético, presentan una alta eficacia de su expresión. El mayor problema que plantea es que hay que transfectar las células de forma individual, lo que requiere un amplio esfuerzo y no permitiría su uso en ensayos clínicos (Pausnitz, 2004).

- Electroporación. La aplicación de una corriente eléctrica a células es capaz de abrir poros en la membrana celular que permiten la entrada del gen en su interior. Sin embargo, muchas células mueren al no soportar el choque eléctrico (Mellott y cols., 2012).

5.3.- Transfección de células post-mitóticas mediante nanopartículas

El uso de vectores no-virales fue propuesto para salvar los inconvenientes de los vectores virales. De hecho, los vectores no-virales poseen mayor estabilidad, menor riesgo de seguridad y su síntesis es menos costosa. Aunque se han utilizado con éxito en la transfección de líneas celulares, a pesar de su menor toxicidad, estos compuestos suelen mostrar una transfección génica más baja que los vectores virales, siendo éste su mayor *handicap* para su uso en terapia génica en células post-mitóticas.

En un principio, las técnicas más utilizadas para introducir DNA exógeno en células eucarióticas se basaba en la coprecipitación con fosfato de calcio, así como en otros métodos basados en el uso de compuestos con elevado peso molecular como el dextrano (Fraley y cols., 1982; Nicolau y cols., 1987). El problema era que estos métodos mostraban una elevada variabilidad en la eficiencia de transfección, dependiendo del tipo celular, y mostrando una alta toxicidad en cultivos primarios. La máxima transfección observada fue del 3,5% en neuronas hipotalámicas de ratón, que aumentó al 6,5% cuando se utilizó junto con dietilaminoetil-dextrano (Guerra-Crespo y cols., 2003).

Debido a la baja eficiencia de transfección que ofrecían estos compuestos en células post-mitóticas, se estudiaron otros tipos de compuestos, como los quitosanos y el colágeno. Los quitosanos comprenden una familia de polisacáridos lineales binarios, derivados de polisacáridos catiónicos. Poseen el inconveniente de que la eficiencia de transfección de quitosan/DNA depende de varios factores como su grado de deacetilación, su peso molecular, la concentración de DNA, la relación entre las cargas amino del quitosano y las cargas fosfato del DNA, concentración de suero, pH y tipo celular, lo que hace que su eficiencia de transfección sea muy variable.

Sin embargo, en los últimos años se han estudiado NPs basadas en quitosan para su posible aplicación terapéutica en la liberación de insulina (Zhang y *cols.*, 2008) o DNA (Csaba y *cols.*, 2009) a través de la mucosa (intranasal), gracias a su estabilidad coloidal en los fluidos biológicos. Se han estudiado otros polímeros naturales como posibles vectores no virales, como el colágeno. En este sentido, se ha observado que la eficiencia de transfección aumenta cuando se utiliza colágeno metilado (Wang y *cols.*, 2004), e incluso la forma desnaturalizada del colágeno, la gelatina, ha mostrado ser útil como vector para la liberación génica (Truong-Le y *cols.*, 1999).

En la última década, la cantidad de investigaciones llevadas a cabo en el campo de los vectores no-virales para terapia génica ha aumentado, y se han sintetizado compuestos que muestran resultados prometedores a la hora de transportar material genético, especialmente siRNA, al interior de células neuronales. Los principales vectores no-virales utilizados actualmente para transfectar material genético en diferentes tipos celulares son las NPs, a las que podemos clasificar en distintos grupos como: lípidos catiónicos, derivados de la PEI, dendrímeros y NPs con base de carbono (Pérez-Martínez y *cols.*, 2012c).

-Los estudios con lípidos catiónicos han sido variados. Las formulaciones estudiadas ofrecen una eficiencia de transfección muy baja para poder utilizarlas como NPs terapéuticas en células post-mitóticas, exceptuando el caso de Lipofectamine2000[®], con el que se han descrito reducciones de los niveles de RNAm y proteína diana de un 70% en neuronas de hipocampo de rata (Yan y *cols.*, 2007).

-En el caso de las NPs derivadas de PEI, la eficiencia de transfección sigue siendo muy baja, desde un 1% en células granulares de cerebelo hasta un 20% en neuronas de los ganglios cervicales superiores (Lambert y *cols.*, 1996). El mayor problema de este tipo de NPs es su toxicidad, relacionada con el peso molecular, estructura y concentración utilizada. Se ha observado que los PEI con elevado peso molecular presentan mayor toxicidad que los de

menor peso molecular (<2000 Da), pero los de bajo peso molecular son menos eficientes en la transfección (Fischer y cols., 1999). Los PEI lineales muestran niveles de transfección menores (9% en neuronas simpáticas) que los PEI que muestran ramificaciones (15% en neuronas hipotalámicas de rata).

-Los dendrímeros son los vectores no virales que muestran la mayor eficiencia de transfección en células neuronales. Por ejemplo, los dendrímeros modificados con arginina (arginina-G4-PAMAM) muestran un 35-40% de transfección en neuronas corticales (Kim y cols., 2006). En este sentido, los éster de PAMAM permitieron liberar siRNA en cultivos primarios mixtos de neuronas y glía, detectándose un 80% de reducción de los niveles de la proteína diana (Kim y cols., 2010), mientras que el dendrímero NN16, con grupos amonio en su periferia, produjo una reducción del 80% en los niveles de proteína diana en neuronas corticales de rata (Posadas y cols., 2009). Un nuevo dendrímero con un núcleo de PPV mostró una gran eficiencia de transfección tanto en neuronas granulares de cerebelo (Rodrigo y cols., 2011) como en neuronas corticales de rata (Posadas y cols., 2012; Pérez-Carrión y cols., 2012).

-Las NPs con base de carbono presentan los inconvenientes de su baja solubilidad y toxicidad. En los últimos años se están realizando diversas modificaciones para solventar estos problemas, como la unión de dendrones PAMAM en la superficie, que les permiten ejercer como vectores eficientes (Herrero y cols., 2009).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- Hipótesis

La hipótesis del presente estudio se basa en que mediante el uso del modelo de toxicidad inducido por el alcaloide VTD, en las células cromafines bovinas se desencadena de forma secuencial una cascada de acontecimientos que comienzan con la entrada masiva de Na^+ , facilitando la despolarización de la membrana celular, lo que conlleva la apertura de los CCVD y a una entrada masiva de Ca^{2+} , activando las rutas que provocan finalmente la muerte celular por sobrecarga de Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} en el interior de la célula que se realiza a través de ciertos CCVD, es fundamental en el inicio y mantenimiento del deterioro celular. El *knock-out* de estos CCVD puede prevenir, al menos parcialmente, este deterioro celular. El empleo de nuevos vectores no virales que permitan inhibir de forma selectiva la síntesis de subunidades $\alpha 1$ que componen los CCVD, nos puede permitir identificar los CCVD responsables de la entrada de este ión en las células cromafines bovinas tras la exposición a VTD y, por tanto, determinar el papel que juegan los diversos tipos de canales en la muerte inducida por este alcaloide en las células cromafines bovinas. Este abordaje innovador permite superar las ambigüedades que han surgido de la falta de selectividad completa de los fármacos y toxinas utilizados en la disección farmacológica de los CCVD.

2.- Objetivos

Los objetivos del presente trabajo consistieron en:

- 1.- Establecer un modelo fiable y reproducible de toxicidad inducida por *Veratridina* (VTD) en células cromafines bovinas.
- 2.- Testar y evaluar un vector no-viral, TRANSGEDEN[®] (TGD), para internalizar siRNA en las células cromafines bovinas en cultivo.
- 3.- Estudiar la contribución de las subunidades de los CCVD Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 (tipo L), Cav2.2 (tipo N), Cav2.1 (tipo P/Q) y Cav2.3 (tipo R) en la entrada de Ca²⁺ tras el estímulo con VTD en células cromafines bovinas.
- 4.- Comprobar la relación entre el incremento de la [Ca²⁺]_i y los procesos tóxicos inducidos por VTD en células cromafines bovinas, y disminuir los efectos de la sobrecarga de Ca²⁺ en las células cromafines mediante el *knock-down* de los diferentes canales de calcio voltaje-dependientes, a través del mecanismo de RNAi.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Cultivo primario de células cromafines bovinas

Las células cromafines de la médula adrenal se aislaron a partir de glándulas adrenales bovinas, extraídas de los animales en un matadero local y transportadas hasta el laboratorio a 4°C en solución de Locke (en mM: 154 NaCl; 5,6 KCl; 3,6 NaHCO₃; 5,6 glucosa; 5 Hepes; pH 7,4), suplementada con 50 UI/mL de penicilina (Sigma, Barcelona, España), 50 µg/mL de estreptomycin (Sigma) y 1mM de glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA). El protocolo de cultivo utilizado fue la digestión de la médula adrenal con colagenasa descrito por Livett en 1984, con las modificaciones introducidas por nuestro grupo (Jordán y cols. 2000).

Una vez en la unidad de cultivos, se retiró el tejido graso periadrenal y se inició el lavado de la glándula mediante la inyección de 30 mL de solución de Locke, a través de la vena adrenolumbar (o vena medular central). Este procedimiento de lavado se repitió varias veces, con el fin de eliminar los eritrocitos existentes en los vasos sanguíneos de la glándula. El siguiente paso fue la digestión enzimática, realizada con solución de Locke con 0,25% de colagenasa (Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN), inhibidor de tripsina al 0,5% (Sigma) y albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) al 0,5%. En esta etapa se inyectó la solución de Locke/colagenasa a través de la vena suprarrenal, y se incubó a 37°C, permitiendo así la acción óptima de la enzima. La inyección de esta solución enzimática se repitió un total de 3 veces, durante 15 minutos cada vez.

Finalizada la fase de digestión, la glándula se seccionó longitudinalmente y se extrajo la médula, que se disgregó de forma mecánica (Fig. 15), y se incubó nuevamente en solución de Locke/colagenasa a 37°C durante 30 minutos para asegurarnos de su completa digestión.

Pasados los 30 minutos, se diluyó la solución de incubación mediante la adición de 100 mL de solución de Locke, y se filtró la suspensión obtenida a través de una malla de nylon, lo que permitió eliminar pequeños restos de médula no digerida. La suspensión celular que se obtuvo, se centrifugó a 500 rpm [48 xg; Rotor RS-720; Kubota (Kubota, Tokio, Japón)] durante 15 minutos para sedimentar las células. Después de la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y el precipitado celular se resuspendió en solución de Locke suplementada con 0,5% de BSA (Sigma) y 2,5 mM de Ca^{2+} .

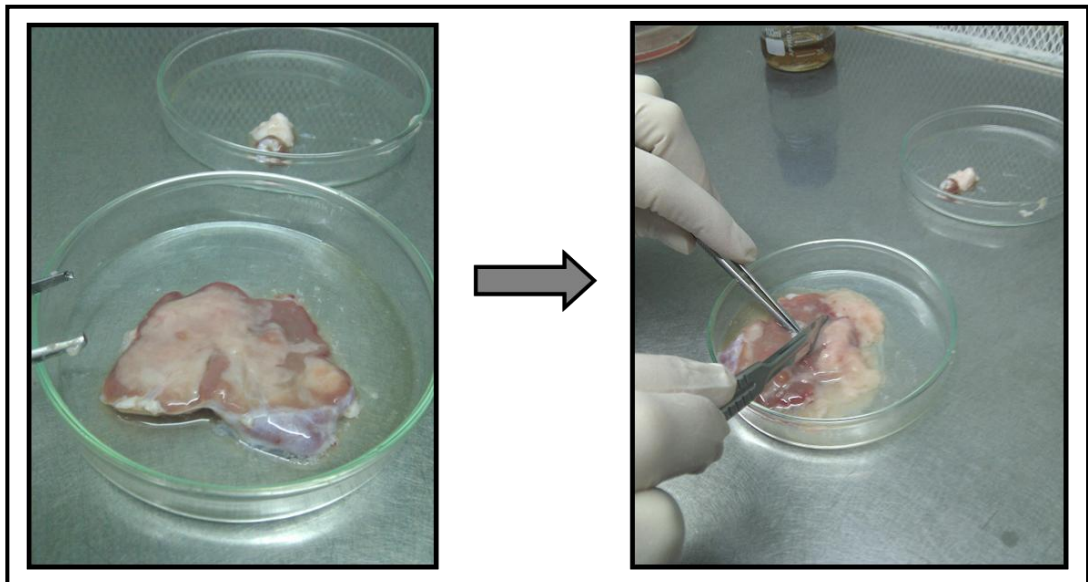


Figura 15.-Disgregación mecánica de la médula de la glándula suprarrenal bovina durante el protocolo de cultivo de células cromafines bovinas.

A continuación, se realizó una separación y purificación en gradiente de Percoll[®] (Sigma). Para ello, se adicionó una solución Percoll[®]/Locke (90:10 v/v) estéril a la suspensión celular (50/50 v/v), y tras mezclar ambas soluciones, se centrifugaron durante 20 minutos, a 13.200 rpm [22.000 xg; Rotor JA 25.50; Beckman Coulter Avanti J-25I (Beckman, Barcelona, España)] y a temperatura ambiente. Tras esta centrifugación se pudo apreciar la formación de varias bandas en el gradiente, entre las que cabe destacar una banda superior, que contiene células cromafines adrenérgicas y

noradrenérgicas, y una capa inferior de células cromafines, principalmente adrenérgicas. Más abajo, se observó una capa de hematíes residuales del proceso (Fig. 16).

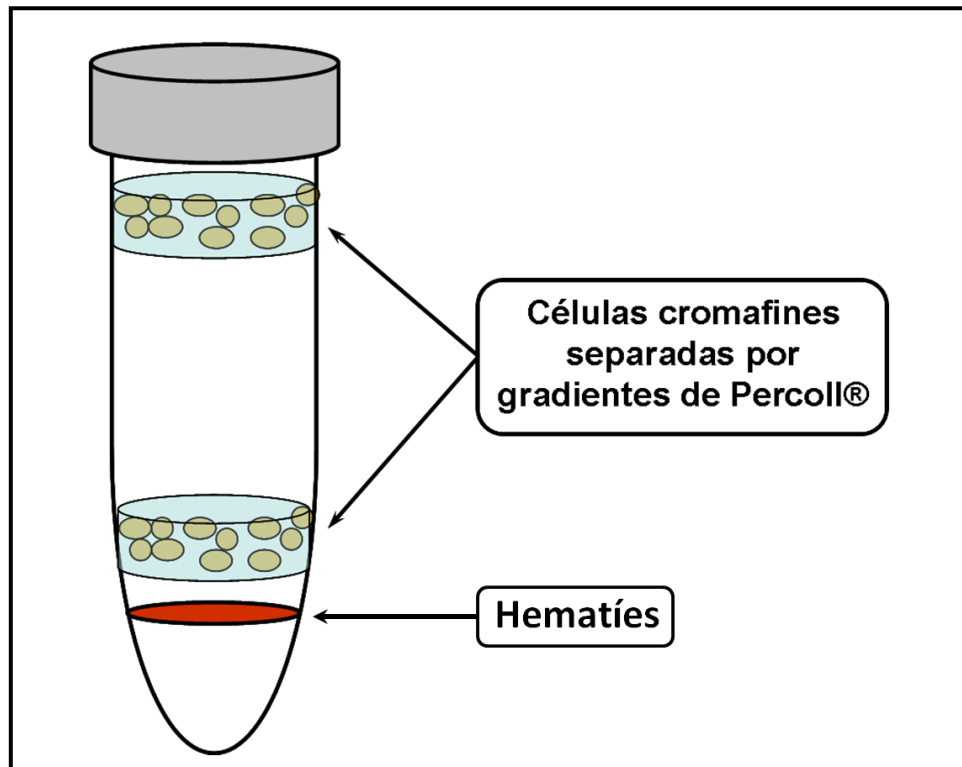


Figura 16.- Esquema de la muestra tras la separación y purificación en gradiente de Percoll®.

Tras recoger las células cromafines contenidas en las dos capas descritas, se procedió a lavar el Percoll® mediante la adición de 100-150 mL de solución de Locke y su posterior centrifugación durante 15 minutos a 500 rpm [48 xg; Rotor RS-720; Kubota (Kubota, Tokio, Japón)]. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces, descartando los restos de Percoll® que pudiesen existir. El precipitado celular resultante de la última centrifugación se resuspendió en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen), 1 mM de glutamina y antibióticos (50 UI/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina).

Las células cromafines se sembraron en placas o cristales previamente tratados con 50 µg/mL de poli-L-lisina (poli-L, Sigma) a una concentración de 10^5 células/cm² (Fig. 17), y se mantuvieron a 37°C en un incubador con atmósfera saturada en agua y 5% de CO₂. En los experimentos se utilizaron células de 1 a 5 días de cultivo.



Figura 17.- Células cromafines en cultivo.

2.- Caracterización del cultivo de células cromafines por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía es un método físico de separación utilizado para la caracterización de mezclas complejas, teniendo aplicaciones útiles en todas las ramas de la ciencia y la física. El conjunto de técnicas que engloba la cromatografía están basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Las primeras separaciones con resultados positivos por medio de métodos cromatográficos fueron llevadas a cabo por Tswett en el año 1906.

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas se utiliza una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra la muestra a través de una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido fijado en un sólido. Gracias a la naturaleza de las fases móvil y estacionaria, los componentes de la muestra interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de que los componentes hayan pasado por la fase estacionaria, separándose, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto.

Aunque clásicamente la HPLC sólo necesitaba disponer de las dos fases implicadas en el proceso y de una columna de separación, debido al pequeño diámetro de las partículas de fase estacionaria que se utilizan actualmente, se requiere otros dispositivos adicionales que constituyen el cromatógrafo:

- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes).
- Dispositivo de inyección.
- Conducciones y conexiones.

- Detector y registrador.
- Columna.

Dentro de la HPLC, podemos distinguir distintos tipos:

- Cromatografía de fase normal (NP-HPLC). Se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. La NP-HPLC cayó en desuso a los años setenta con el desarrollo del HPLC de fase reversa o *Reversed-phase HPLC* debido a la falta de reproducibilidad de los tiempos de retención.
- Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC). Consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. Se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar.
- Cromatografía de exclusión molecular. También conocida como *cromatografía por filtración* en gel, separa las partículas de la muestra en función de su tamaño. Generalmente se trata de una cromatografía de baja resolución de forma que se suele utilizar en los pasos finales del proceso de purificación. También es muy útil para la determinación de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas purificadas.
- Cromatografía de intercambio iónico. La retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmovilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Este tipo de cromatografía es ampliamente utilizada en la purificación de agua, concentración de componentes traza, *Ligand-exchange chromatography, Ion-exchange chromatography of proteins, High-pH anion-exchange chromatography of carbohydrates and oligosaccharides, etc.*

- *Cromatografía basada en bioafinidad.* Basada en la capacidad de las sustancias biológicamente activas de formar complejos estables, específicos y reversibles. La formación de estos complejos implica la participación de fuerzas moleculares como las interacciones electrostáticas, dipolo-dipolo, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, entre las partículas de la muestra y la fase estacionaria.

Para nuestros estudios utilizamos la RP-HPLC.

2.1.- Determinación de secreción de catecolaminas en células cromafines

Hemos utilizado RP-HPLC para la determinación de las catecolaminas (CAs), adrenalina y noradrenalina, secretadas por las células cromafines bovinas en cultivo. Estas moléculas presentan propiedades de óxido-reducción que pueden detectarse gracias a este comportamiento químico, por lo que se decidió emplear la técnica de detección electroquímica.

Para este tipo de experimentos, las células cromafines se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 10^5 células/cm² y, tras 3 días en cultivo, las células se lavaron durante 30 minutos con 500 μ L de Krebs-HEPES (en mM: 140 NaCl; 5 KCl; 1,2 MgSO₄; 2,5 CaCl₂; 15 HEPES; 11 glucosa; pH 7,4). Los parámetros que hemos estudiado han sido: 1) liberación basal de CAs; 2) liberación de CAs tras estimulación con K⁺; 3) contenido celular de CAs post-estimulación; y 4) cantidad total de CAs en las células cromafines bovinas. Para ello, tras el lavado, primero se incubaron las células durante 5 minutos con Krebs-HEPES y se retiró para determinar en esta solución la liberación basal de CAs. A continuación, las mismas células se incubaron durante otros 5 minutos con Krebs-HEPES suplementado con una elevada concentración de K⁺ (75 mM), que se recogió (para medir la liberación de CAs en la estimulación) y se sustituyó de nuevo por solución Krebs-HEPES (para medir la liberación de CAs post-estimulación durante 5 minutos adicionales). Esta última solución se sustituyó por 500 μ L de ácido perclórico (0,05 N), las células se rasparon y se centrifugaron a 1.500 rpm

[100 xg; rotor FA-45-30-11, Eppendorf 5417R (Eppendorf Iberica, Madrid, España)] durante 5 minutos, obteniéndose un sobrenadante que contenía las CAs no liberadas por las células.

El volumen de muestra necesario para el análisis de CAs fue de 100 μ L, que se inyectaron mediante un sistema de bombeo Gilson Modelo 234 (Gilson Medical Electronics, Francia) utilizando un programa isocrático con un flujo constante de 1 mL/minuto, pasando a través de una precolumna de fase reversa C18 de Supelco (Sigma; 5 μ m tamaño de partícula, 30 mm de longitud y 4 mm de diámetro) y una columna LiChrosphere 100 RP-18 (HP Series 1200, Hewlett-Packard, Estados Unidos), con un tamaño de partícula de 5 μ m, 4 mm de diámetro y 125 mm de longitud.

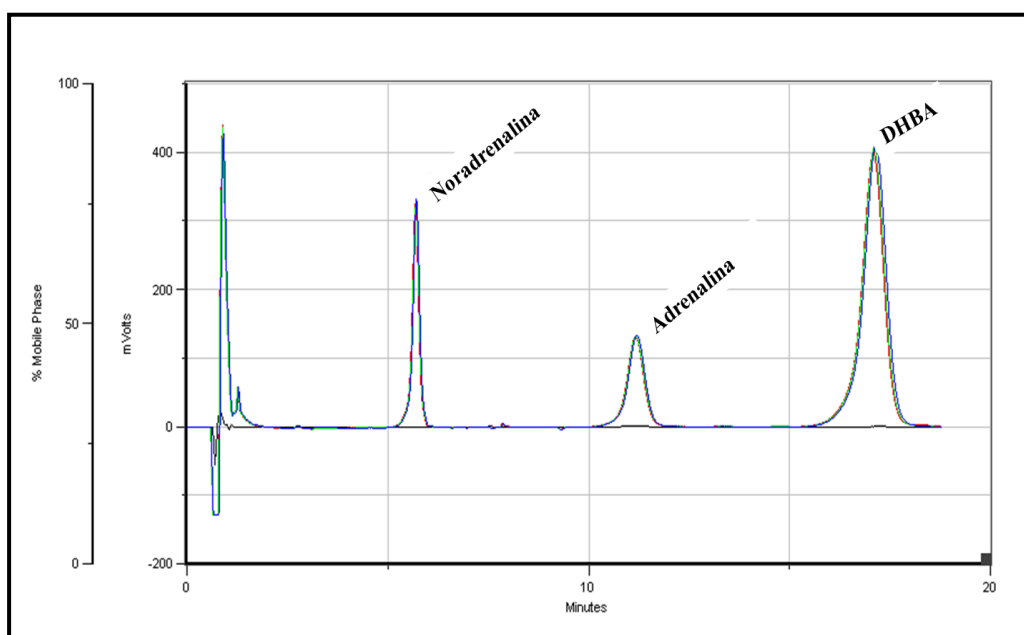


Figura 18. Análisis diferencial de CAs por HPLC acoplada a detección electroquímica. Ejemplo de cromatograma, obtenido según las condiciones cromatográficas descritas en el texto, de una muestra patrón utilizada para comprobar la reproducibilidad de los resultados. Dicha muestra patrón tiene una composición conocida: 5 ng de noradrenalina, 5 ng de adrenalina y 10 ng de dihidroxibenzilamina (DHBA).

La fase móvil utilizada fue igual a la descrita anteriormente para estudios similares (Kempf y Mandel, 1981), con la siguiente composición (en mM): 80 NaH_2PO_4 ; 0,13 EDTA; 5 ácido heptasulfónico; 10% de metanol; pH 3,2, ajustado con ácido ortofosfórico. Antes de su utilización la fase móvil se introdujo en un baño de sonicación durante 15 minutos, favoreciendo así su desgasificación.

El detector electroquímico utilizado fue el Coulochem II (modelo 5200; ESA, Estados Unidos) que consta de dos células analíticas (ESA 5011): el voltaje de la célula 1 o de oxidación se fijó a -50 mV y se ajustó a una sensibilidad de 100 μA ; el voltaje de la célula 2 o de reducción se fijó en +250 mV y con una sensibilidad de 500 nA. La detección fue integrada, cuantificando el área bajo la curva de los picos obtenidos y calculada la concentración de CAs por estándar interno mediante el software de Gilson (Modelo 714, Unipoint[®], Francia) siguiendo un método estándar. La secreción de CAs (tanto para adrenalina como noradrenalina) se expresó como porcentaje liberado frente al contenido total de aminas presente en las células al comienzo del experimento. Como estándar interno se utilizó dihidroxibenzilamida (DHBA).

Los tiempos de retención para la columna LiChrosphere 100 RP-18 (HP Series 1200, Hewlett-Packard, Estados Unidos), expresados como media \pm sem, fueron (Fig. 18):

- Noradrenalina: $5,28 \pm 0,7$ minutos (n=16)
- Adrenalina: $10,40 \pm 0,9$ minutos (n=16)
- DHBA: $15,62 \pm 0,5$ minutos (n=16)

3.- Empleo de nanopartículas y siRNA en células cromafines bovinas

3.1.- Formación de los dendriplejos (dendrímero/siRNA)

La denominación "dendriplejo" hace referencia al complejo formado por el dendrímero unido de forma electrostática al siRNA. Los dendriplejos se formaron mezclando cantidades iguales de volumen de un dendrímero con núcleo de PPV denominado TGD, y de siRNA (Qiagen, Valencia, CA), disueltos en agua tratada con dietil pirocarbonato al 0,1% (v/v en agua destilada) (agua DEPC) (Rodrigo y cols., 2011; Pérez-Carrión y cols., 2012). Los dendriplejos se realizaron con distintas concentraciones de TGD y siRNA dependiendo de la concentración molar deseada, y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación suave.

3.2.- Caracterización de la unión dendrímero/siRNA

El estudio de la capacidad que posee una NP para acoplar siRNA y formar un dendriplejo, la estabilidad de ese dendriplejo y el efecto protector del dendrímero frente a las RNAsas que se encuentran en fluidos biológicos, como la sangre o en los medios de cultivo, son pruebas que nos determinan el potencial efecto de una NP para transfectar material genético (Haberland y cols., 2008; Zou y cols., 2008).

En general, la electroforesis permite la separación de moléculas como consecuencia de su diferente movilidad en un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato. Por tanto, en una electroforesis, los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo, es decir, el ánodo.

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que tiene la propiedad de mantenerse en estado sólido a temperatura ambiente, pero que a altas temperaturas se torna líquida. Esta característica permite una fácil preparación de una matriz porosa para ser usada en electroforesis. La

concentración de agarosa típicamente utilizada para electroforesis de material genético está entre el 0,5% y el 2% (peso/volumen), estableciéndose que, a mayor concentración, menor tamaño de los poros de la matriz, y viceversa.

Para la visualización de los ácidos nucleicos se utilizó un colorante fluorescente, el bromuro de etidio (BrEt, Sigma). Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA y el RNA. Debido a esta propiedad es un agente mutagénico y debe manipularse con cuidado. El BrEt generalmente se incorpora a la agarosa antes de polymerizar el gel, o puede incorporarse tras la electroforesis. Su emisión se detecta con un transiluminador u otra fuente de luz ultravioleta (UV).

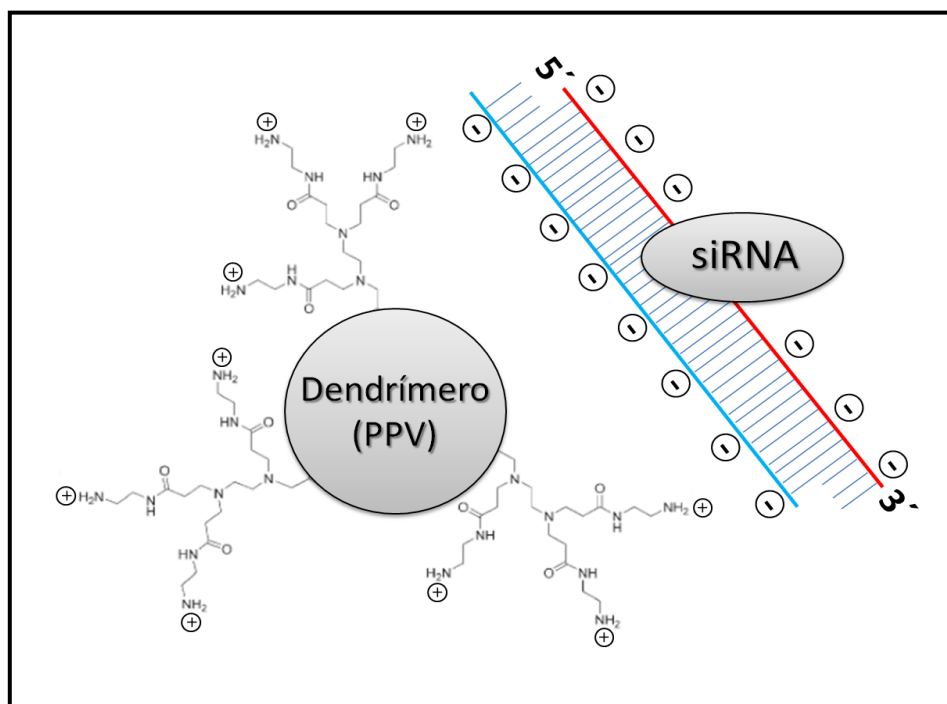


Figura 19.- Esquema de las interacciones electrostáticas entre dendrímero y siRNA.

En nuestros estudios, utilizamos un dendrímero que posee cargas positivas, por los grupos amino (NH_3^+) de su periferia, a un pH neutro, y moléculas de siRNA cargadas de forma negativa, debido a los grupos fosfatos

de los extremos (Fig. 19). Cuando estos se unen de forma electrostática forman un dendriplejo, y las cargas quedan compensadas, formando una molécula neutra, que no avanzará en el gel de agarosa, ya que su carga es nula. Para conocer la concentración exacta que debemos utilizar para que todo el siRNA esté acoplado con el dendrímero, necesitamos conocer la relación N/P (relación entre el número de grupos amino con carga positiva del dendrímero y el número de fosfatos con carga negativa del siRNA) con el que se consigue que todas las cargas positivas y negativas estén interactuando. Si la relación no es la correcta, encontramos una molécula cargada de forma positiva o negativa, que podremos discriminar por su avance en el gel de agarosa. Por otro lado, el estudio de esa fuerza de unión entre el dendrímero y el siRNA, además de la protección que ejerce la NP sobre la posible degradación del siRNA en presencia de RNAsas, es necesario para la caracterización correcta de la unión dendrímero/siRNA.

% Gel	Agarosa (g)	TAE 1X (ml)
1,2	0,6	50
Tris-Acetato EDTA (TAE) 10X		
Tris base		48,4 g
Acido Acético Glacial		11,42 ml
EDTA 0,5M (pH=8)		20 ml
H ₂ O DEPC (o comercial)		Hasta 1L

Tabla 2.- Reactivos para el realizar el gel de agarosa utilizado en la electroforesis.

3.2.1.- Retardo en gel de agarosa

El retardo en gel de agarosa se utilizó para caracterizar nuestro dendrímero. En primer lugar, necesitamos conocer la relación dendrímero/siRNA adecuada para obtener la mayor eficiencia de unión

posible entre ambas moléculas, es decir, que todas las cargas negativas del siRNA (42 cargas negativas/molécula siRNA), queden neutralizadas con las del dendrímero (15 cargas positivas/molécula TGD). Se estudiaron los dendriplejos formados a distintas relaciones N/P, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación suave.

Para preparar el gel de agarosa al 1,2%, se mezclaron las cantidades de agarosa y TAE 1X mostradas en la Tabla 2, se calentó la mezcla en un microondas hasta que se disolvió la agarosa. En este punto, se añadieron 5 μ L de BrEt (10 mg/mL, Sigma). Se añadió a la cubeta de electroforesis, y colocamos los peines para generar los pocillos. Se dejó gelificar a temperatura ambiente. A continuación, se rellenó la cubeta con TAE 1X hasta cubrir el gel, y se cargaron las muestras, preparadas con Buffer de carga 10X (500 μ L Glicerol, 500 μ L TAE 1X y 2,5 mg de Azul de Bromofenol), en los distintos carriles. La electroforesis se realizó durante 15 minutos a 60 mV en un gel de agarosa al 1,2%, conteniendo 0,017% de BrEt. Los geles se fotografiaron bajo iluminación UV en un transiluminador, y las bandas se cuantificaron con un sistema de análisis de imagen apropiado (Quantity One, BioRad, Munich, Germany).

3.2.2.- Ensayos de desplazamiento con heparina

Los experimentos de desplazamiento con heparina se llevaron a cabo para evaluar la fuerza de unión entre el dendrímero TGD y el siRNA, estudiando así la capacidad que tiene el ambiente aniónico del interior de la célula de desplazar las moléculas de siRNA de su unión al dendriplejo y liberarlo intacto, con actividad biológica, antes de que fuera degradado en los lisosomas. Los experimentos se realizaron incubando los dendriplejos formados a una relación N/P de 3,5, con cantidades crecientes (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 μ g heparina/ μ g TGD) de heparina (Sigma, Barcelona, España). Este compuesto compite con la unión electrostática del siRNA al dendrímero, ya que posee una elevada densidad de cargas negativas (es polianiónico), desplazando al ácido nucleico. Estos experimentos nos proporcionan una idea sobre la fuerza de unión del dendrímero/siRNA. Si esta fuerza de unión es

demasiado fuerte, el dendrímero no será capaz de liberar el siRNA al interior celular, y no tendrá lugar el silenciamiento. La mezcla se corrió en un gel de agarosa, bajo las mismas condiciones que el ensayo de retardo en gel antes descrito.

3.2.3.- Efecto protector del dendrímero sobre la degradación del siRNA por RNAsas

Para evaluar el efecto protector del dendrímero, los dendriplejos formados a una relación N/P de 3,5 o siRNA sólo, se incubaron con 0,25% de RNAsa A (Sigma, Barcelona, España) durante 30 minutos a 37 C. Tras la incubación, las muestras se enfriaron a 4°C y se expusieron a un exceso de heparina (2,5 µg heparina/µg TGD), para asegurar la disociación total del siRNA del dendriplejo, y se corrieron en las mismas condiciones que los experimentos anteriormente descritos.

Todas estas pruebas descritas anteriormente se realizaron un mínimo de 2 veces para comprobar la reproducibilidad de los resultados.

3.3.- Estudio de la transfección y toxicidad del dendriplejo

Junto a otras pruebas, los estudios de citometría de flujo se realizaron para evaluar la captación del dendriplejo TGD/siRNA por las células cromafines de la médula adrenal y la toxicidad del mismo.

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. Trabaja con células en suspensión que pasan de forma unitaria (gracias a la formación de un estrecho tubo de fluido envolvente), por delante de un láser de excitación, con una longitud de onda determinada, recogándose parámetros como: la difracción frontal de la luz (reflejo del tamaño celular), la reflexión lateral (reflejo de la complejidad celular) y determinadas emisiones (reflejo de la presencia de determinados marcadores fluorescentes en la célula); gracias a una serie de detectores con sus correspondientes espejos dicróicos y filtros

de emisión (Fig. 20). De esta forma, ofrece información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas, y la relación entre los parámetros de las células.

Para estudiar la captación del dendrímero por células cromafines, se sembraron en placas de 6 pocillos (tratadas previamente con poli-L) a una concentración de 10^5 células/cm².

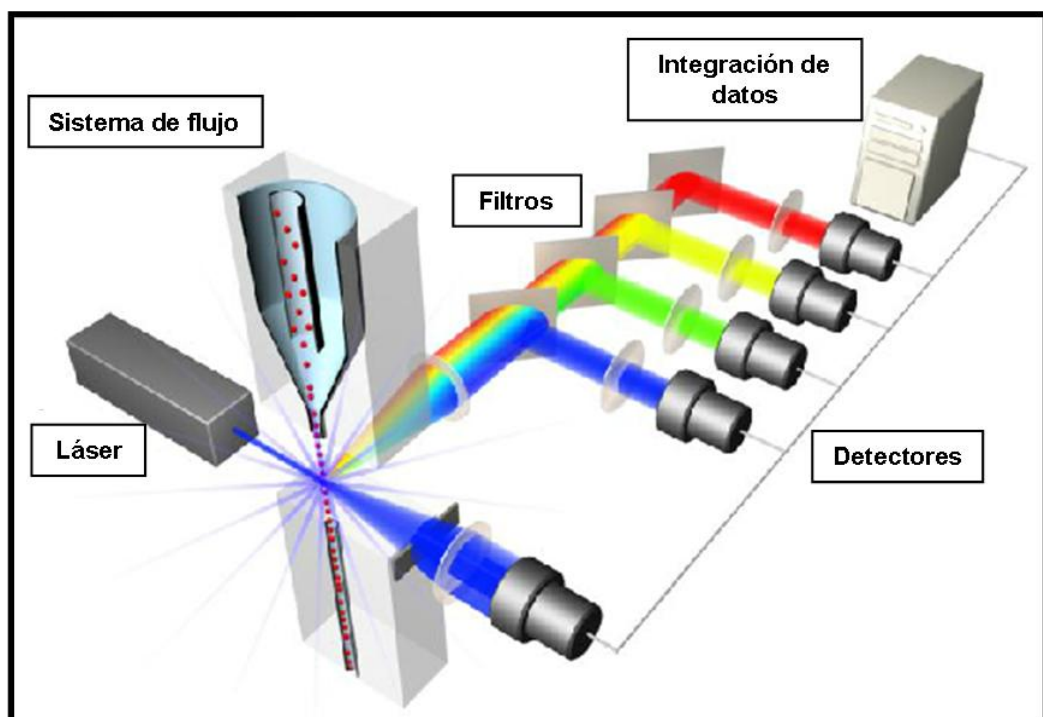


Figura 20.- Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo.

Una de las características de este dendrímero, es que es capaz de emitir fluorescencia cuando se excita con luz UV gracias a su núcleo de PPV (longitud de onda de excitación de 310 nm y de emisión de 406 nm), por lo que de esta forma, la medición se puede realizar observando directamente la emisión de la NP, y colocalizarla si se le une otro fluoróforo.

Se realizaron los siguientes tratamientos:

- unas muestras se incubaron con 100 nM de siRNA marcado con fluoresceína (FAM-siRNA) sólo, actuando como control, descartando así la posibilidad de que el FAM-siRNA pudiera captarse por la célula sin necesidad de un vector que lo introduzca, durante un tiempo de 24-72 h.
- otras se incubaron con los dendriplejos formados por 100 nM de FAM-siRNA a distintas relaciones N/P (de 6 a 48), durante 24-72h.

La concentración de siRNA utilizada en todos los tratamientos fue de 100 nM, y la del dendrímero TGD fue variando para conseguir las relaciones N/P deseadas.

Tras los tratamientos correspondientes, se recogieron los medios de cultivo, las células se separaron del fondo de la placa mediante la adición de tripsina-EDTA (Sigma) al 25% durante 3 minutos, y se lavaron con un tampón fosfato-salino (PBS). Las células totales (vivas y muertas), presentes en la suspensión resultante al unir la suspensión celular y el medio condicionado, se centrifugaron a 1.200 rpm [120 xg; rotor FA-45-30-11, Eppendorf 5417R (Eppendorf Iberica, Madrid, España)] durante 5 minutos.

La captación de los dendriplejos fue estudiada utilizando siRNA marcado con fluoresceína. Para ello, las células cromafines fueron sembradas en cristales de 20 mm de diámetro previamente tratados con poli-L. La transfección se llevó a cabo mediante dendriplejos formados por 2 μ M del dendrímero TGD y 100 nM de FAM-siRNA (ratio N/P de 7,1), durante 24-120 horas a 37°C en una atmósfera saturada con 95% de O₂ y 5% de CO₂. Tras los distintos periodos de incubación, la internalización celular del dendriplejo se evaluó estudiando la emisión fluorescente que emite el FAM-siRNA (longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 520 nm) utilizando un microscopio Leica DMRXA y una cámara Leica DC500 (Nikon, Melville, NY). La eficiencia de transfección se evaluó mediante el recuento de las células fluorescentes, con respecto al número total de células contadas en 6 regiones diferentes, elegidas al azar, de cada cristal.

3.4.- Estudio del silenciamiento génico mediante la reversotranscriptasa-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time RT-PCR)

Para realizar los estudios de silenciamiento génico, se sembraron las células en en placas de 6 pocillos tratadas previamente con poli-L (Sigma), a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células por pocillo. Se trataron con los siguientes dendriplejos:

Dendriplejo	CCVD de estudio
2 μ M TGD + 100 nM Cav1.1 siRNA	CCVD tipo L (α 1S)
2 μ M TGD + 100 nM Cav1.2 siRNA	CCVD tipo L (α 1C)
2 μ M TGD + 100 nM Cav1.3 siRNA	CCVD tipo L (α 1D)
2 μ M TGD + 100 nM Cav2.1 siRNA	CCVD tipo P/Q (α 1A)
2 μ M TGD + 100 nM Cav2.2 siRNA	CCVD tipo N (α 1B)
2 μ M TGD + 100 nM Cav2.3 siRNA	CCVD tipo R (α 1E)
2 μ M TGD + 100 nM Cav2.1 siRNA + 100 nM Cav2.2 siRNA	CCVD tipo P/Q (α 1A) + tipo N (α 1B)

Tabla 3.- Dendriplejos utilizados en los tratamientos de las células cromafines.

Las secuencias de los siRNA utilizados para la transfección fueron las siguientes:

Gen	Secuencia siRNA	Localización
CACNA1C, tipo L (Cav1.2)	5' ..CAAGGUGUGGUACGUGGUCAAtt 3' 3' acGUUCCACACCAUGCACCAGUU.. 5'	4008-4028
CACNA1S, tipo L (Cav1.1)	5' ..GAAGACGAGCCCGAGGUCCCAAtt 3' 3' acCUUCUGCUCGGGCUCCAGGGU.. 5'	2288-2308
CACNA1D, tipo L (Cav1.3)	5' ..UUGAUCCUGAGAAUGAAGAAGtt 3' 3' agAACUAGGACUCUUACUUCUUC.. 5'	1343-1363
CACNA1B, tipo N (Cav2.2)	5' ..CCGGACUGCAUUGGAGAUCAAtt 3' 3' gtGGCCUGACGUAACCUCUAGUU.. 5'	5495-5515
CACNA1A, tipo P/Q (Cav2.1)	5' ..CGCGGUGGAUAAUCUGGCUAAtt 3' 3' gtGCGCCACCUAUUAGACCGAUU.. 5'	2170-2190
CACNA1E, tipo R (Cav2.3)	5' ..CCGAGCGUGCUUCAUGAACAAAtt 3' 3' ttGGCUCGCACGAAGUACUUGUU.. 5'	744-764

Tabla 4.- Secuencias diana de los CCVD de células cromafines bovinas. Se comprobó que las secuencias fueran específicas, y no coincidieran con ningún otro gen.

3.4.1.- Aislamiento de RNA total

El RNA total celular se aisló mediante un método estándar con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (TriPure[®] Isolation Reagent, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El TriPure[®] Isolation Reagent es un reactivo que lisa las células y desnaturaliza las nucleasas endógenas. Por ello, en un único paso se consigue la homogenización celular, y con la adición de cloroformo y su posterior centrifugación, se consigue una separación en tres fases: una fase incolora acuosa (parte superior), una interfase de color blanquecino (parte intermedia) y una fase rosa (parte inferior), en la parte más inferior (Fig. 21). A continuación, se recoge la fase acuosa superior y se separa en un tubo de 1,5 mL nuevo. De ella obtendremos, tras su precipitación con isopropanol, el RNA. Al final, la calidad y la concentración de RNA se evaluaron por espectrofotometría (Infinite 200, Tecan, Salzburg, Austria) y corriendo un gel

de agarosa, para confirmar la integridad de las bandas de los RNA ribosomales 18S y 28S, y la ausencia de contaminación con DNA genómico.

Para realizar el aislamiento total del RNA, en primer lugar, retiramos el medio y procedimos a lavar las células con PBS un total de tres veces. A continuación, recogimos las células en 200 μ L de Tripure[®], en tubos de 1,5 mL e incubamos durante 5 minutos a 4°C. El siguiente paso fue la adición de 100 μ L de Cloroformo (Sigma) a cada tubo, que fue agitado en vórtex durante 15-30 segundos, tras la cual se dejó en incubación durante 15 minutos a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se observó la formación de las tres fases descritas anteriormente (Fig. 21), y se procedió a extraer la parte acuosa superior incolora que contenía el RNA, y se depositó en otro tubo de 1,5 mL.

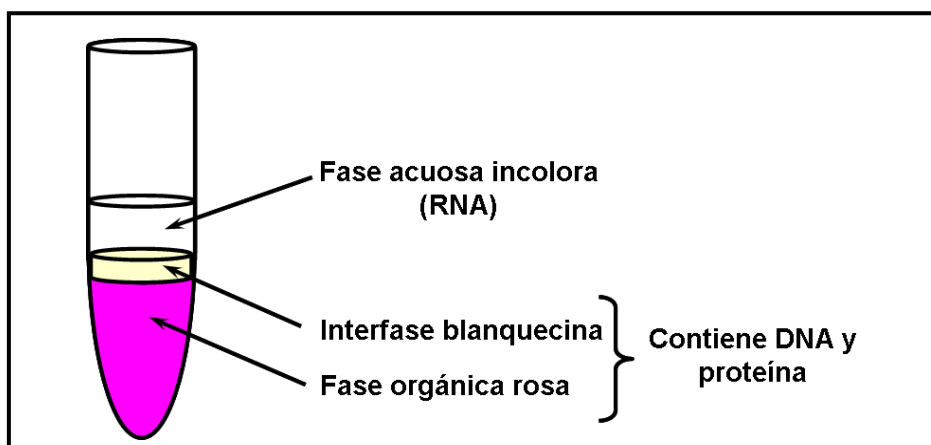


Figura 21.- Visualización de la muestra tras la primera centrifugación.

A este tubo, con la fase acuosa incolora, se le añadió un volumen de 250 μ L de isopropanol (Sigma), se agitó mediante inversión y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Transcurridos los 30 minutos, se centrifugó a 10.500 rpm [11.700 xg; rotor FA-45-30-11; eppendorf 5417R (Eppendorf Iberica, Madrid, España)] durante 10 minutos, a 4°C. El sobrenadante se desechó, y se le adicionaron 500 μ L de etanol (EtOH, Sigma) al 75%, tras lo que se centrifugó a 10.500 rpm [11.700 xg; rotor FA-45-30-11; eppendorf 5417R (Eppendorf Iberica, Madrid, España)] durante 5 minutos, a 4°C. Finalmente, se retiró el

sobrenadante, y se resuspendió el precipitado resultante (RNA) en 10 µL de agua DEPC estéril y se procedió a su cuantificación por espectrofotometría (Infinite 200, Tecan, Salzburg, Austria).

3.4.2.- Síntesis de DNA copia (cDNA)

El RNA total extraído, siempre que no mostrara ningún signo de degradación o contaminación con DNA genómico, se transformó en cDNA (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) y éste se utilizó para realizar la real time RT-PCR. La reacción se realizó utilizando procedimientos estándar para el equipo StepOnePlus Real Time PCR System para la SYBR Green Master Mix fast (Applied Biosystems). La temperatura de anillamiento de los primers fue de 60°C. La reacción de la real time RT-PCR se mantuvo a 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de: 95°C durante 15 segundos y 60°C durante un minuto. En cada experimento, se calculó la media del ciclo umbral [cycle threshold (C_T)] de los triplicados de cada uno de los genes estudiados y del gen utilizado como referencia, pudiendo así comparar la expresión génica tras los diferentes tratamientos (Pan *y cols.*, 2007; Gras *y cols.*, 2009).

Los primers utilizados fueron: **Cav1.1 (α1S)**: 5'-CAG TGC CAC CGC ATT GTC AAT GAC A-3' [sentido (Fw)] y 5'-CTT TCC CTT GAA GAG CTG GAC CCC-3' [antisentido (Rv)]; **Cav1.2 (α1C)**: 5'-CGA AGC TTC TTC ATG ATG AAC ATC T-3' (Fw) y 5'-GCG GAT CCA TGT AGA AGC TGA TGA A-3' (Rv); **Cav1.3 (α1D)**: 5'-GAT CTG GCA AAA CAG TGA TTT C-3'(Fw) y 5'-GTG AAG ACC ATG TTC AGA ATG T-3' (Rv); **Cav2.1 (α1A)**: 5'-GCA AAG GAA AGG ACA TCA ACA-3'(Fw) y 5'-AGA GAG AAG AGG GAG GTG AAG-3'(Rv); **Cav2.2 (α1B)**: 5'-GGA AAG ACA TCA GCA CCA TCA AG-3'(Fw) y 5'-GGG AAA GAC CAC AAA GTA GAC-3'(Rv); y **Cav2.3 (α1E)**: 5'-AGC AGG AAC CGA CAA GGA ACC-3'(Fw) y 5'-GGC GGC CAA TCG ATG AGC TTC-3'(Rv); **GAPDH**: 5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3' (Fw) y 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'(Rv). El gen GAPDH se utilizó como gen de referencia para todos los experimentos de real time RT-PCR.

4.- Modelo de muerte por VTD

Como hemos mencionado anteriormente, la VTD es una toxina que ha sido utilizada ampliamente como modelo de muerte celular inducido por sobrecarga de Ca^{2+} intracelular en células cromafines como ha sido demostrado por nuestro grupo y por otros (Jordán y cols., 2000, 2002, 2003; Cano-Abad y cols., 2001).

Para inducir la muerte, se utilizó una solución madre de 100 mM de VTD, que se diluyó en proporción 1:1.000 en medio de cultivo DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con 1 mM de glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y antibióticos (50 UI/mL de penicilina y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina (Sigma, Barcelona, España), para conseguir la dosis deseada de 100 μM de VTD. El tiempo de incubación con VTD (100 μM) dependió del estudio a realizar, debido a que se han estudiado procesos que acontecen tras diferentes periodos de exposición a VTD, pero su efecto siempre se estudió 24 horas después del inicio de la exposición.

4.1.- Estudios de incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células cromafines bovinas tras estimularlas con VTD (100 μM) se determinaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando la sonda ratiométrica sensible al Ca^{2+} Fura-2, en su forma de éster acetoximetilo (Fura-2 AM, Invitrogen).

Las formas éster, como la utilizada en estos estudios, son moléculas hidrofóbicas e insensibles a la presencia de iones, capaces de atravesar la membrana plasmática. Una vez en el citosol, los enlaces éster son hidrolizados por esterasas intracelulares, liberándose la forma polianiónica del compuesto y quedando atrapada en el interior celular.

Las sustancias fluorescentes pueden emitir a una o varias longitudes de onda (λ), dando lugar a un espectro de emisión. Las sondas fluorescentes sensibles al Ca^{2+} (el ión que desencadena los mecanismos de muerte, y por

tanto el que nos interesaba estudiar en este trabajo) son fluoróforos que pueden unirse de forma selectiva y reversible al Ca^{2+} , como resultado de lo cual varían sus propiedades ópticas: cambia su espectro de excitación (como en el caso del Fura-2) o de emisión (como en el Indo-1) o bien la intensidad de la fluorescencia que emiten (como Fluo-3 o Fluo-4). La mayoría de estas sondas fluorescentes sensibles al Ca^{2+} son moléculas policarboxiladas que derivan del ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), que fueron desarrolladas inicialmente por el grupo de Tsien y colaboradores (Tsien y *co/s.*, 1980; Grynkiewicz y *co/s.*, 1985; Minta y *co/s.*, 1989).

Con la sonda Fura-2, debido a la intensidad de fluorescencia que emite por molécula, se puede obtener una buena relación señal/ruido con concentraciones pequeñas (1-5 μM), evitando así problemas de tamponamiento del Ca^{2+} , que podrían producirse al ser derivados de BAPTA. Además, es ideal para medir las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se producen en modelos de muerte celular, similares al utilizado en esta Tesis Doctoral. Por último, cabe destacar que la intensidad de fluorescencia del Fura-2 aumenta a medida que el compuesto liga Ca^{2+} , al mismo tiempo que el espectro de excitación se desplaza hacia el azul.

La ventaja fundamental de las sondas ratiométricas con respecto a las no ratiométricas (aquellas en las que la unión de Ca^{2+} únicamente produce un cambio en la intensidad de fluorescencia emitida, pero no un cambio espectral) es que la medida de fluorescencia obtenida es independiente de una serie de factores como: 1) la concentración que haya alcanzado la sonda en el interior celular, 2) variaciones en la intensidad/trayecto de la excitación y en la eficiencia de la detección, 3) el grado de "*photobleaching*" de la sonda (proceso por el cual la luz excitadora genera la transformación irreversible de la sonda en metabolitos intermediarios igualmente fluorescentes pero con una afinidad por el Ca^{2+} mucho menor o incluso nula) y 4) la tasa de extrusión de la sonda por parte de transportadores de aniones orgánicos presentes en las membranas celulares como la P-glicoproteína.

Para el estudio de las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ tras la exposición a VTD, las células se sembraron a una concentración de $0,2 \times 10^6$ células/cm², en cristales de 20 mm de diámetro, tratados previamente con poli-L. Tras los tratamientos correspondientes, las células se incubaron con 5 μ M de Fura-2 AM (durante 1 hora), a 37°C. A continuación, y una vez en el microscopio, las células fueron estimuladas de forma aguda con VTD (100 μ M). Para el estudio del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ se utilizó un microscopio Leica DMRXA, con los filtros de fluorescencia adecuados (λ de excitación a 340 y 380 nm), captándose una λ de emisión a 520 nm mediante una cámara Leica DC500.

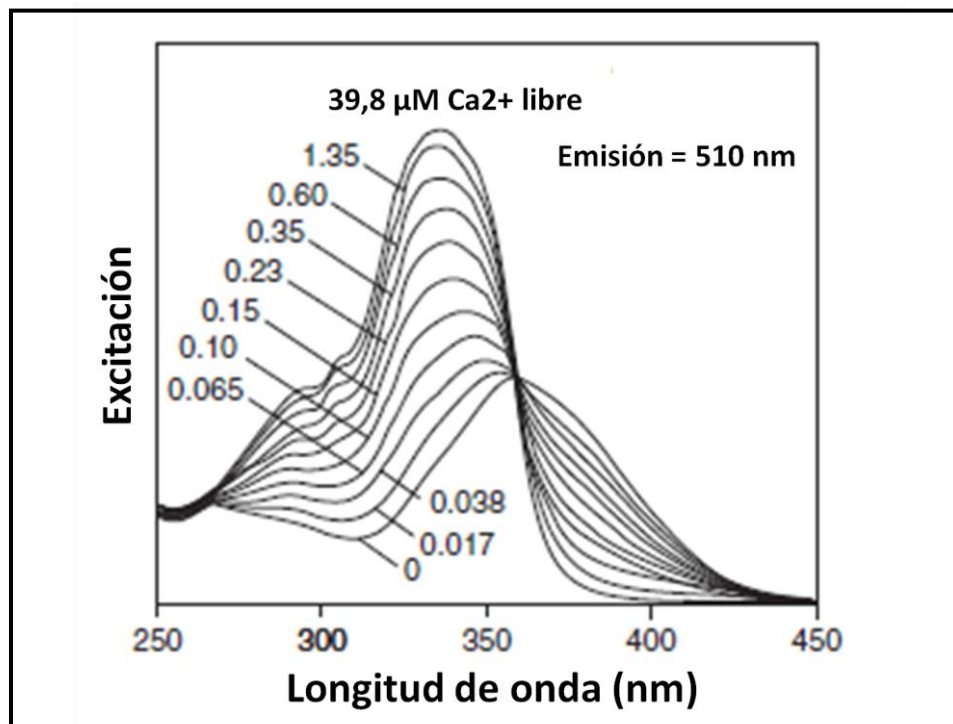


Figura 22.- Espectro de excitación de Fura-2 en presencia de concentraciones de 0 a 39,8 μ M de Ca^{2+} libre.

Los cambios en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ se expresaron mediante la relación (F_{340}/F_{380}) entre la emisión de fluorescencia a 510 nm con una longitud de onda de excitación de 340 nm (Fig. 22) y la emisión de fluorescencia a 510 nm con una longitud de onda de 380 nm (Grynkiewicz y cols., 1985). El

incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de cada célula se realizó mediante el cálculo del área bajo la curva. De este modo, el aumento del área bajo la curva refleja el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, independientemente de que sea o no oscilatorio (López y cols., 1995; Jordán y cols., 2000).

4.2.- Estudios de viabilidad celular

La viabilidad de las células cromafines bovinas ante los diferentes tratamientos, tanto con VTD (100 μ M) como con TGD, se estudió utilizando las siguientes técnicas:

4.2.1.- Estudio de células positivas a Ioduro de Propidio mediante citometría de flujo

Las células cromafines se sembraron en placas de 24 pocillos tratadas previamente con poli-L, a una concentración de 10^5 células/cm², y se realizaron los tratamientos correspondientes.

Para medir el porcentaje de células permeables a ioduro de propidio (IP, Sigma, Barcelona, España), es decir, muertas, se retiraron los medios de cultivo, se lavaron con un tampón fosfato-salino (PBS) y se incubaron en un volumen de 400 μ L de medio de cultivo con un 3% de FBS, que contenía 5 μ g/mL de IP durante 30 minutos a 37°C. Las células se separaron del fondo de la placa mediante la adición de tripsina-EDTA (Sigma) al 25%, durante 3 minutos. Seguidamente, se añadieron 400 μ L de medio de cultivo, y la suspensión celular se centrifugó a 1.200 rpm [120 xg; rotor FA-45-30-11, Eppendorf 5417R (Eppendorf Iberica, Madrid, España)] durante 5 minutos. El precipitado celular resultante se resuspendió en medio de cultivo con un 3% de FBS, siguiendo un protocolo descrito previamente (Lee y cols., 2004). A continuación, las células se inyectaron en el citómetro de flujo modelo BD-LSR (BD Biosciences), y a partir de la evaluación de 10^4 células se calculó el porcentaje de células positivas para IP (porcentaje de toxicidad). Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia respecto al grupo control (tratado con vehículo) (Carrión y cols., 2011).

4.2.2.- Reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT)

Las células cromafines se sembraron en placas de 24 pocillos tratadas previamente con poli-L, a una concentración de 10^5 células/cm², y se realizaron los tratamientos correspondientes.

Este ensayo es un método colorimétrico cuantitativo que se basa en la reducción de MTT por la acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, generando cristales de formazán insolubles en medio acuoso, pero solubilizables mediante el uso de disolventes orgánicos. Este producto puede ser cuantificado espectrofotométricamente.

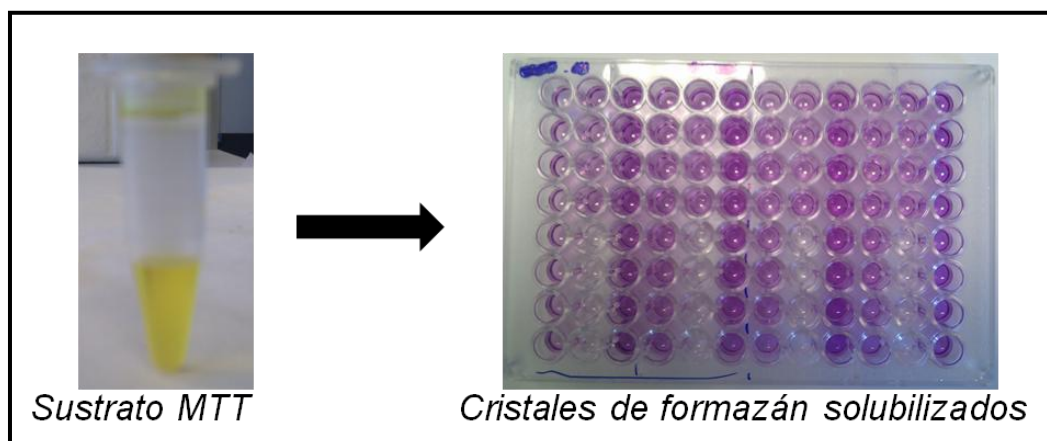


Figura 23.- Esquema de la transformación del MTT. A la izquierda el stock de MTT, y a la derecha los cristales de formazán disueltos.

Para medir la actividad mitocondrial (marcador de la funcionalidad y viabilidad celular), se retiró el medio de incubación, y tras lavar los pocillos con PBS, se añadió un volumen de 400 μ L del medio de cultivo que contenía MTT (Sigma, Barcelona, España) a una concentración de 5 mg/mL. Tras una incubación de 4 horas, se retiró el sobrenadante y los cristales insolubles de formazán formados se disolvieron en 200 μ L de DMSO. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Infinite 200) a una λ de 540 nm, empleando una λ de referencia de 690 nm. La viabilidad celular (actividad mitocondrial) se

expresó como porcentaje de MTT transformado en formazán respecto al grupo control (tratado con vehículo) (Posadas y cols., 2007).

4.2.3.- Determinación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Para los experimentos de viabilidad celular, las células se sembraron en placas de 24 pocillos tratadas previamente con poli-L, a una concentración de 10^5 células/cm². Se realizaron los correspondientes tratamientos y, una vez completados, los efectos tóxicos se evaluaron midiendo la liberación de la enzima LDH al sobrenadante utilizando el kit *CytoTox96*[®] (Promega, Madison, USA). Para ello, se recogieron los sobrenadantes y las células fueron lavadas con PBS, levantadas mecánicamente, y lisadas con tritón X-100 al 0,9% (v/v) en PBS. La absorbancia del lisado y del sobrenadante celular se leyó utilizando un espectrofotómetro (Infinite 200) a una longitud de onda de 490 nm, según el protocolo del kit comercial utilizado. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de LDH liberada por las células al medio de cultivo con respecto al total de LDH (LDH liberada + LDH presente en los lisados celulares) (Posadas y cols., 2007).

4.3.- Producción de ROS

Como se ha descrito antes, en el apartado 3.3 de la sección de Material y Métodos, la citometría de flujo permite el estudio de la fluorescencia emitida individualmente por cada célula marcada con el fluoróforo adecuado. Para medir la producción de ROS se utilizó el protocolo descrito previamente (Lee y cols., 2004), pero incubando las células con 5,6-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA, Invitrogen) durante 15 minutos a 37°C. A continuación, las células se inyectaron en el citómetro de flujo modelo BD-LSR (BD Biosciences), y a partir de la evaluación de 10^4 células se calculó el porcentaje de células positivas para CM-H2DCFDA, es decir, la producción de ROS. Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia respecto al grupo control (tratado con vehículo) (Carrión y cols., 2011).

4.4.- Determinación de la actividad caspasa 3

Las caspasas son proteínas capaces de hidrolizar otras proteínas en sitios específicos (Stennicke *y cols.*, 1999). Aprovechando esta característica, la actividad caspasa 3, que participa en las fases finales del proceso de apoptosis (Boatright y Salvesen, 2003), se puede cuantificar gracias al diseño de secuencias peptídicas, específicamente reconocidas como sustrato, a las que se ha unido un fluoróforo o cromóforo que se activa al ser separado por la hidrólisis específica que ejerce esta enzima.

Se utilizó el sustrato fluorogénico Z-DEVD-AFC (Calbiochem, Cambridge, MA, USA), que es reconocido por la caspasa 3, que contiene la secuencia de reconocimiento Aspártico-Glutámico-Valina-Aspártico (DEVD), y está unida al fluoróforo 7-amino-4-trifluorometil cumarina (AFC), que emite fluorescencia al hidrolizarse el péptido. La intensidad de fluorescencia generada por el fluoróforo activado es directamente proporcional a la actividad caspasa 3 presente en las células cromafines bovinas estudiadas.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, tratadas previamente con poli-L, a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células por pocillo. Tras los tratamientos correspondientes, las células fueron lavadas con PBS y despegadas mediante tripsinización. El precipitado resultante tras centrifugar las células a 1.200 rpm [150 xg; rotor FA-45-30-11, Eppendorf 5417R (Eppendorf Iberica, Madrid, España)], 5 minutos a 4°C, se resuspendió en un tampón de lisis (en mM: 100 HEPES, 5 DTT, 5 EGTA, 0,04% Nonidet P-40 y 20% glicerol, pH 7,4) y se incubó 60 minutos a 4°C, tras lo que se procedió a centrifugar las muestras a 4.200 rpm [1.800 xg; rotor FA-45-30-11, Eppendorf 5417R (Eppendorf Iberica, Madrid, España)] durante 15 minutos a 4°C.

La concentración de proteína en los sobrenadantes se determinó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), siguiendo un protocolo estándar (Pierce, Rockfork, IL). Se preparó el reactivo de trabajo mezclando el reactivo A con el reactivo B, en una proporción de 50:1, respectivamente.

Se utilizó una curva de calibrado con concentraciones crecientes de BSA (Sigma) 0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1 mg/mL, y se cargó una placa de 96 pocillos transparente con 10 μ L de cada punto de la curva de calibrado (concentración conocida) por duplicado, y 10 μ L de las muestras problema por triplicado. Se añadieron 200 μ L de reactivo de trabajo por pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Infinite 200) a una λ de 540 nm, y los resultados se interpolaron con las concentraciones conocidas de la curva de calibrado.

Una vez conocida la concentración de proteínas de los extractos celulares, se utilizaron 30 μ g de proteína por muestra, y se incubaron con un buffer de reacción (en mM: 25 HEPES, 10 DTT, 10% sucrose y 0,1% 3-[(3-cholamido propyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid) que contenía 50 μ M de sustrato fluorescente Z-DEVD-AFC, a 37°C durante 1 hora. La fluorescencia emitida se determinó en un espectrofotómetro (Infinite 200) a una λ de excitación de 400 nm y una λ de emisión de 505 nm (Jordán y cols., 2004).

5.- Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media (media \pm sem), de un mínimo de tres experimentos diferentes. Las diferencias entre los grupos, para cada uno de los parámetros analizados, se analizaron utilizando el test Kruskal-Wallis. Un valor de probabilidad (p-valor) menor a 0,05 se consideró significativa ($p < 0,05$). El software SPSS 13.0 (Chicago, IL) se utilizó para realizar todo el análisis estadístico.

RESULTADOS

1.- Caracterización del cultivo de células cromafines bovinas

Las células presentaron un aspecto morfológico similar al que se ha descrito previamente (Livett, 1984). En la figura 17 se pueden observar células en cultivo fotografiadas 72 horas después de ser sembradas en cristales de 20 mm de diámetro, previamente tratados con poli-L. Mediante su visualización con luz de transmisión, estas células presentaron ciertas características inequívocas, como su forma redondeada (esféricas en cultivo) y su tendencia a agregarse entre sí en grupos de hasta varias decenas de células (Fenwick y cols., 1978).

Estudios fisiológicos han demostrado que las CAs adrenalina y noradrenalina se almacenan en las células cromafines de la médula adrenal (Hillarp y Hökfelt, 1953; Eranko, 1955). Mediante la determinación por HPLC de la cantidad de noradrenalina y adrenalina contenida en las células en cultivo, se estimó el porcentaje de células cromafines adrenérgicas o noradrenérgicas que presentaban nuestros cultivos.

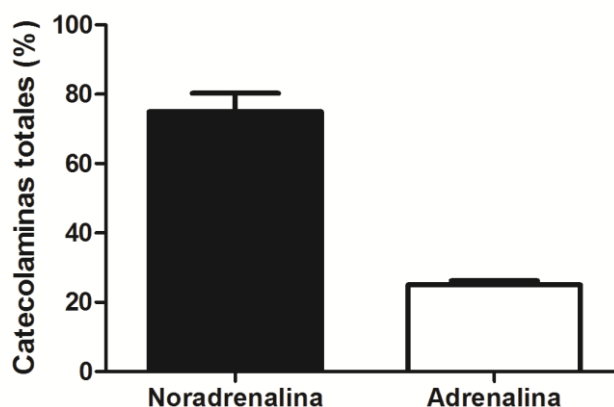


Figura 24.- Estimación del porcentaje de células noradrenérgicas y adrenérgicas mediante la determinación de CAs por HPLC. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=23).

Se calculó el contenido porcentual de noradrenalina y adrenalina (Fig. 24), mediante separación por HPLC acoplada a un detector electroquímico, según

se describe en la sección Material y Métodos. En nuestros cultivos obtuvimos, basándonos en el contenido de las diferentes aminas, un $74,9 \pm 5,3\%$ de células cromafines noradrenérgicas y un $25,1 \pm 1,2\%$ de adrenérgicas (n=23).

Por otro lado, estudiamos como parámetro representativo de la funcionalidad de las células cromafines, la capacidad de secreción de CAs en respuesta a la exposición a elevadas concentraciones de K^+ extracelular (75 mM). En nuestros cultivos de células cromafines de la médula adrenal bovina, se observaron dos poblaciones celulares, una mayoritaria que secretaba preferentemente noradrenalina y otra que secretaba principalmente adrenalina. El incremento de la concentración de K^+ hasta 75 mM en el medio extracelular durante 5 minutos provocó una respuesta secretora que alcanzó niveles máximos de $14,6 \pm 1,4\%$ del contenido celular de noradrenalina y $4,9 \pm 0,9\%$ del contenido celular de adrenalina (n=16) sobre el contenido total de cada CA (Fig. 25). Concentraciones mayores de K^+ en el medio extracelular no provocaron mayores niveles de secreción.

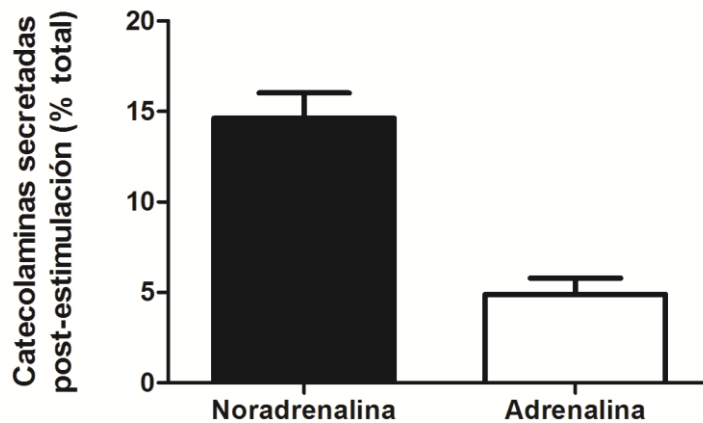


Figura 25.- Estimación del porcentaje de secreción de CAs tras la estimulación con K^+ (75 mM) durante 5 minutos, determinadas por HPLC. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=16).

2.- Caracterización de la interacción TGD/siRNA

2.1.- Formación y estabilidad del dendriplejo

Las cargas positivas de la periferia del dendrímero TGD pueden neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfatos del siRNA. De este modo, se pudo observar la retención del siRNA, debida a la unión electrostática con el dendrímero a distintas relaciones N/P, donde N representa las cargas positivas de los nitrógenos protonados del dendrímero, y P las cargas negativas de los fosfatos del siRNA. Al aumentar la relación N/P, es decir, la cantidad relativa de cargas positivas, disminuyó la cantidad de siRNA libre, ya que existía más siRNA reaccionando con el dendrímero. Con una relación N/P igual a 3,5 (Fig. 26, carril 3), se observó que todo el siRNA estaba completamente retenido por TGD y no se observaba siRNA libre.

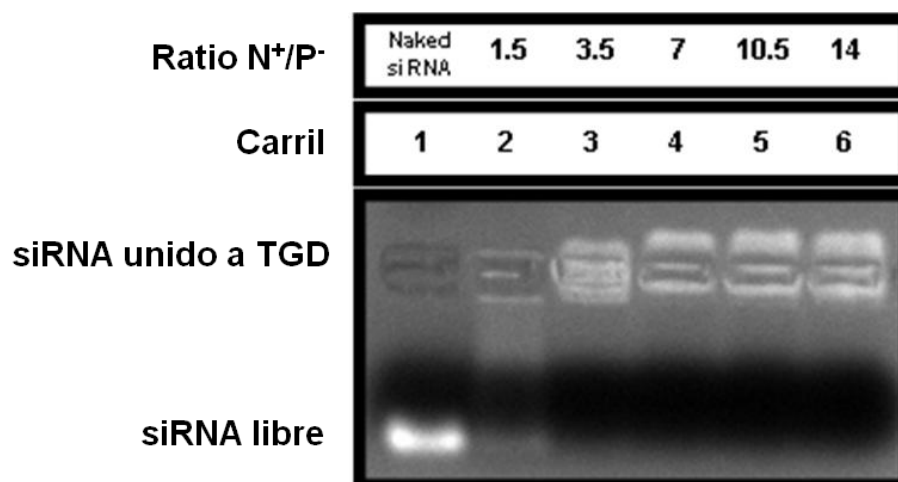


Figura 26.- Estabilidad del dendriplejo TGD/siRNA. Se realizó un retardo en gel de agarosa al 1,2%. El orden de carga de los pocillos fue el siguiente: carril 1: siRNA sólo; carril 2: relación N/P de 1,5; carril 3: relación N/P de 3,5; carril 4: relación N/P de 7; carril 5: relación N/P de 10,5; y carril 6: relación N/P de 14.

Se estudió la fuerza de la unión entre siRNA y el dendrímero, mediante el ensayo de desplazamiento con heparina. Los experimentos se realizaron incubando los dendriplejos formados a una relación N/P de 3,5, con cantidades crecientes (0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 y 2,5 μg heparina/ μg TGD) de heparina (Sigma). Este compuesto compite con la unión electrostática del siRNA al dendrímero, ya que posee una elevada densidad de cargas negativas, desplazando al ácido nucleico. Se observó que el siRNA se liberó completamente del dendrímero cuando la relación heparina (μg)/TGD (μg) fue de 2,5 (Fig. 27, carril 8).

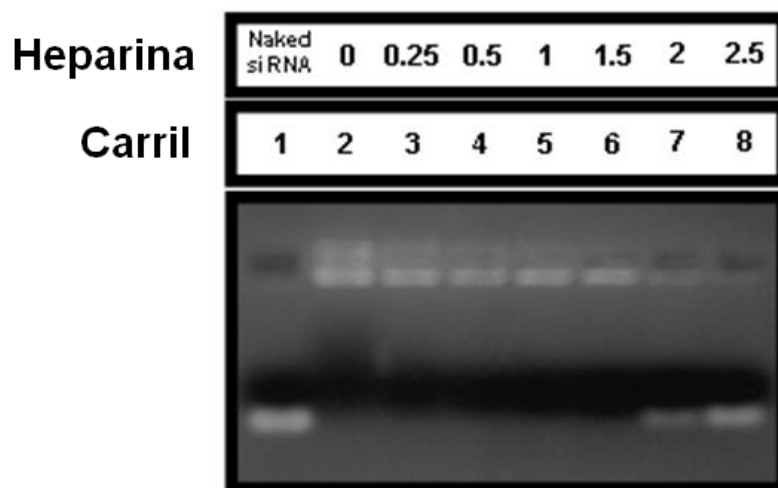


Figura 27.- Ensayo de desplazamiento con heparina. Se realizó un retardo en gel de agarosa al 1,2%. El orden de carga de los pocillos fue el siguiente: carril 1: siRNA sólo; carril 2: relación heparina/TGD de 0; carril 3: relación heparina/TGD de 0,25; carril 4: relación heparina/TGD de 0,5; carril 5: relación heparina/TGD de 1; carril 6: relación heparina/TGD de 1,5; carril 7: relación heparina/TGD DE 2; y carril 8: relación heparina/TGD de 2,5.

2.2.- Protección del siRNA ante la degradación por RNAsas

Para comprobar un posible efecto protector del dendrímero TGD sobre el siRNA, realizamos un ensayo de protección de RNAsas.

Observamos que en presencia de RNasa A al 0,25%, el siRNA unido a TGD no mostró signos de degradación cuando fue desplazado con heparina (Fig. 28, carril 5), mientras que el siRNA sin la presencia de TGD fue degradado por las RNAsas (Fig. 28, carril 3). Esto indicó, que el dendrímero es capaz de proteger al siRNA de la acción de las RNAsas.

siRNA	+	+	+	+	+
Dendrímero	-	+	-	+	+
RNasa	-	-	+	-	+
Heparina	-	-	-	+	+
Carril	1	2	3	4	5

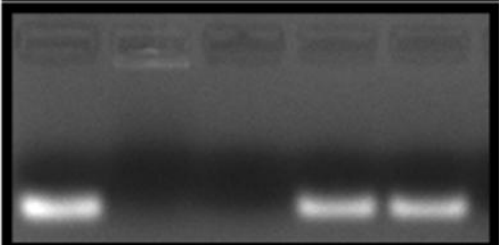


Figura 28.- Protección del siRNA ante la acción de RNAsas. El orden de carga de los pocillos fue el siguiente: carril 1: siRNA sólo; carril 2: dendriplejo formado por TGD/siRNA; carril 3: siRNA + RNasa A (0,25%); carril 4: dendriplejo + heparina (2,5 µg heparina/µg TGD); carril 5: dendriplejo + RNasa (0,25%) + heparina (2,5 µg heparina/µg TGD).

2.3.- Captación y toxicidad de TGD en células cromafines bovinas

2.3.1.- Estudio de la captación de TGD por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia

Las células cromafines bovinas fueron tratadas con 100 μM de FAM-siRNA sólo o con dendriplejos formados con 100 nM de FAM-siRNA y concentraciones crecientes de TGD (1, 2, 4, 6 y 8 μM), con objeto de determinar su grado de incorporación en las células. Tras diferentes periodos de incubación de 24, 48 y 72 horas, se analizaron las muestras en un citómetro de flujo. La incorporación del dendriplejo a una relación N/P de 7 (2 μM TGD/100 nM FAM-siRNA), durante 48-72 horas, alcanzó valores de prácticamente un 100%, manteniéndose los mismos niveles de transfección tras la incubación durante estos tiempos con dendriplejos formados con mayores cantidades del dendrímero (Fig. 29).

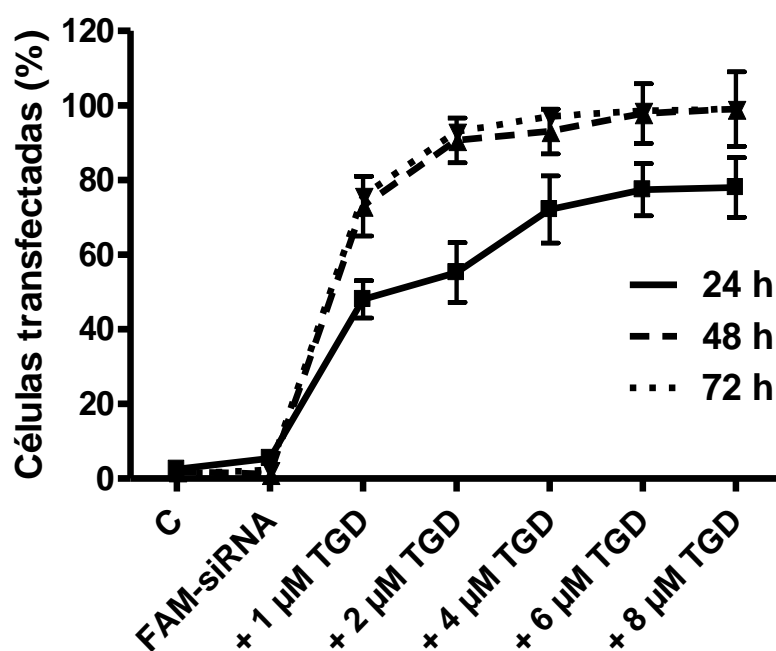


Figura 29.- Determinación del grado de captación de TGD en células cromafines bovinas mediante citometría de flujo. Se realizaron tratamientos con siRNA-FAM sólo y con concentraciones crecientes del dendrímero unido al siRNA-FAM. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3).

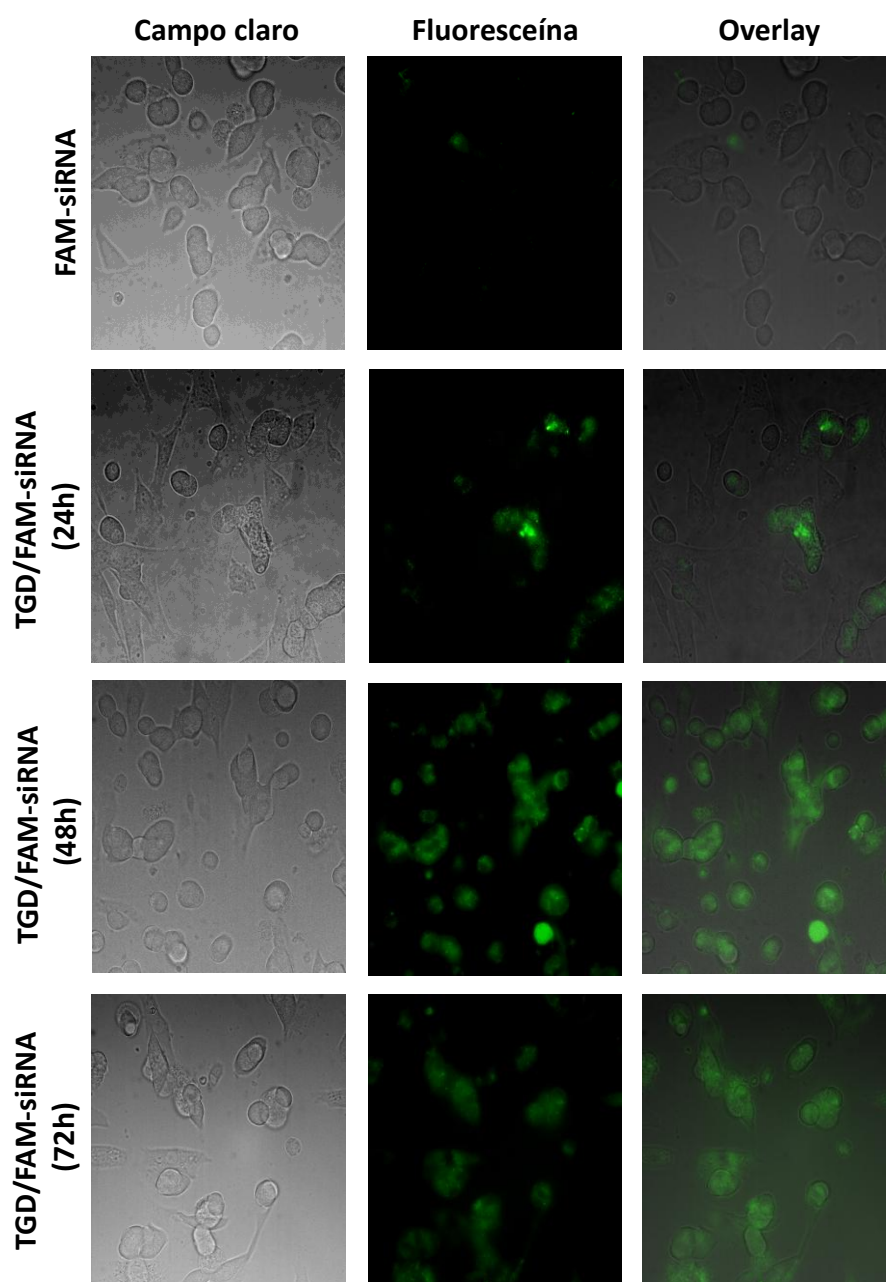


Figura 30.- Transfección de FAM-siRNA y TGD/FAM-siRNA a 24, 48 y 72h. Imágenes de campo claro y fluorescencia para detectar el porcentaje de células cromafines bovinas con FAM-siRNA en su interior.

Para confirmar que el dendriplejo estaba en el interior de las células, las células cromafines, sembradas en cristales de 20 mm de diámetro, se trataron con FAM-siRNA (100 nM) sólo o con el dendriplejo a un ratio N/P de 7 (2 μ M TGD/100 nM FAM-siRNA), durante 24, 48 y 72 horas, y se observó la

cantidad de FAM-siRNA incorporado por las células cromafines mediante microscopía de fluorescencia.

Las células cromafines bovinas tratadas sólo con FAM-siRNA, durante estos periodos de tiempo, prácticamente no mostraron fluorescencia en el interior de las mismas cuando se excitaron a la longitud de onda de 488 nm, y se midió la emisión a 520 nm (Fig. 30). Por el contrario, la incubación de las células cromafines bovinas en presencia de los dendriplejos incrementó el número de células fluorescentes con el tiempo, confirmando que a 48 y 72 horas prácticamente todas las células mostraron positividad para la fluorescencia que emite el FAM-siRNA (λ de excitación/emisión: 488/520 nm).

2.3.2.- Estudio de la toxicidad de TGD en células cromafines bovinas

Al tiempo que se estudió la transfección de los dendriplejos por citometría de flujo, también se estudió la viabilidad celular incubando las células con IP, según se describe en la sección Material y Métodos. Los dendriplejos formados con una concentración de TGD de hasta 4 μ M, no mostraron toxicidad. Sin embargo, dosis mayores a 4 μ M de TGD comenzaron a mostrar un incremento del porcentaje de células positivas a IP, siendo este incremento significativo tras la incubación durante 48-72 horas con los dendriplejos formados con 6 y 8 μ M de TGD (Fig. 31).

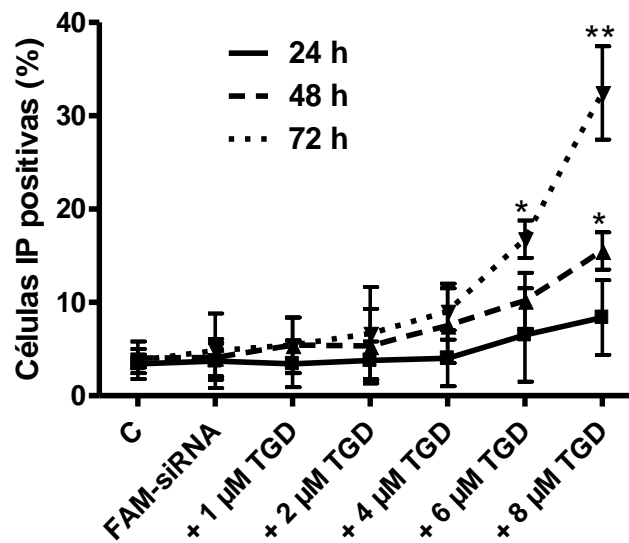


Figura 31.- Estudio de la viabilidad celular por citometría de flujo mediante incubación con IP. Se realizaron tratamientos con siRNA-FAM sólo y con concentraciones crecientes del dendrímero unido al siRNA-FAM, e incubadas con IP. Los resultados vienen expresados como media \pm sem (n=3). *p<0,05, **p<0,01, respecto a las células control (C).

El estudio de la toxicidad del dendrímero mediante otras técnicas de viabilidad celular, como la reducción de MTT y medida del porcentaje de la enzima LDH liberada al medio extracelular, mostraron una reducción del porcentaje de transformación de MTT (actividad mitocondrial) a partir de una concentración de TGD de 4 μ M, a 72 horas de incubación (Fig. 32).

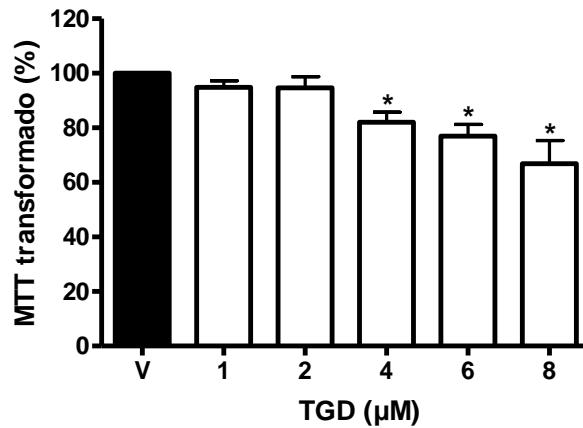


Figura 32.- Toxicidad de TGD tras 72 horas de exposición medida por ensayo de MTT. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de dendrímero. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=6). *p<0,05, respecto a las células tratadas con vehículo (V).

Asimismo, se observó un aumento significativo del porcentaje de la enzima LDH liberada a las dosis de 6 y 8 μ M de TGD, tras 72 horas (Fig. 33).

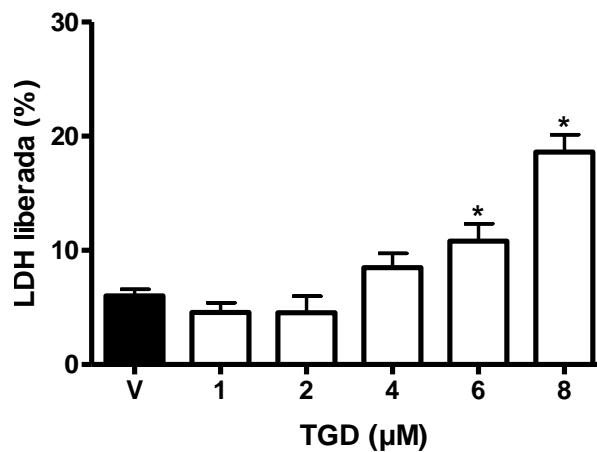


Figura 33.- Ensayo de LDH tras 72 horas de exposición. Las células fueron tratadas con vehículo (V), y con concentraciones crecientes de TGD (1, 2, 4, 6 y 8 μ M). Los datos vienen expresados como media \pm sem, (n=6). *p<0,05, respecto a las células tratadas con vehículo (V).

Dosis iguales o inferiores a 4 μM de TGD no produjeron cambios significativos en ninguno de estos parámetros de toxicidad estudiados en el tiempo de incubación de 72 horas (Figs. 31-33).

2.4.- Producción de ROS

Para medir la producción ROS se utilizó el protocolo descrito previamente, incubando las células CM-H2DCFDA, durante 15 minutos a 37°C. Tras la exposición a distintas concentraciones de TGD durante 72 horas se observó por citometría de flujo que a partir de la dosis de 4 μM de TGD se produjo un incremento en la producción de ROS (Fig. 34).

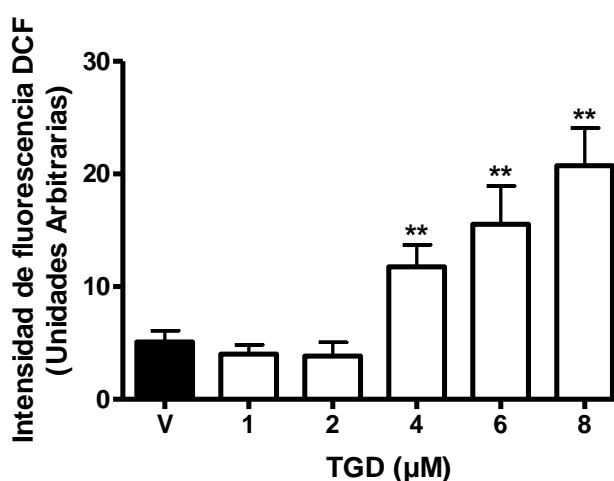


Figura 34.- Estudio de ROS tras 72 horas de exposición a TGD mediante citometría de flujo. Las células se trataron con vehículo (V), o con concentraciones crecientes de TGD (1, 2, 4, 6 y 8 μM), y se incubaron con CM-H2DCFDA. Los datos vienen expresados como media \pm sem, (n=3). **p<0,01, respecto a las células tratadas con vehículo (V).

2.5.- Actividad caspasa 3 inducida por TGD

La determinación de la actividad caspasa 3 se realizó utilizando el sustrato fluorogénico Z-DEVD-AFC (Calbiochem), reconocido por la caspasa 3 a través de la secuencia Aspártico-Glutámico-Valina-Aspártico (DEVD), que está unida al fluoróforo AFC y que emite fluorescencia al hidrolizarse el péptido. La intensidad de fluorescencia generada por el fluoróforo activado fue directamente proporcional a la actividad caspasa 3 presente en los lisados celulares, obtenidos de células tratadas con distintas concentraciones de TGD durante 72 horas. Se observó un aumento de esta actividad enzimática a dosis iguales o superiores a 6 μM , con respecto al detectado en las células tratadas únicamente con vehículo (Fig. 35).

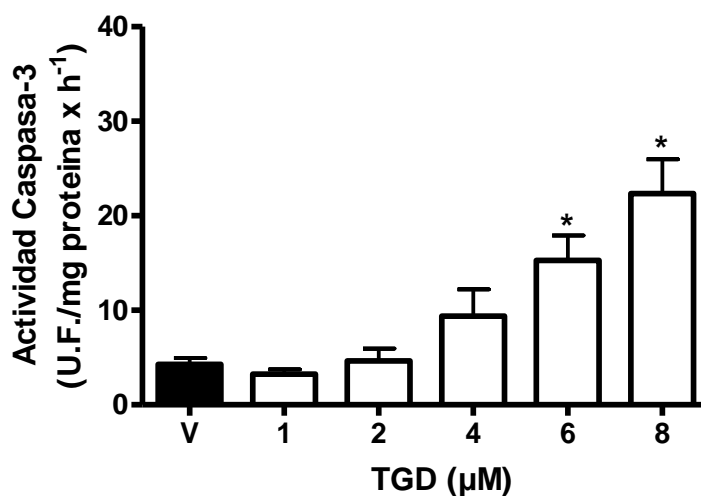


Figura 35.- Estudio de la actividad caspasa 3 tras 72 horas de exposición. Se midió la actividad caspasa 3 en lisados celulares totales obtenidos de células con vehículo (V), y tratadas con concentraciones crecientes de TGD (1, 2, 4, 6 y 8 μM). Los datos vienen expresados como media \pm sem, (n=3). *p<0,05, respecto a las células tratadas con vehículo (V).

3.- Estudio del silenciamiento génico de diferentes subunidades $\alpha 1$ formadoras de los distintos tipos de CCVD por real time RT-PCR

Los niveles de RNAm de los diferentes tipos de CCVD fueron cuantificados mediante real time RT-PCR (Fig. 36):

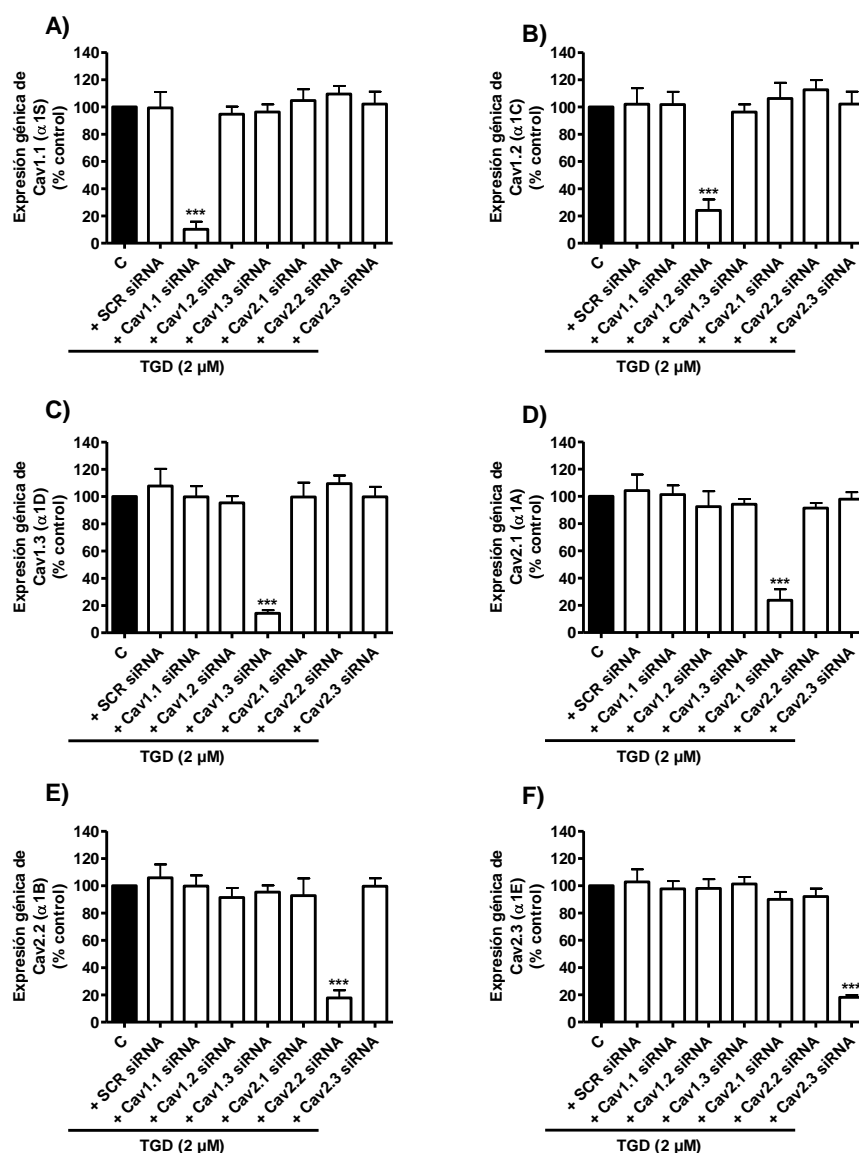


Figura 36.- Estudio del silenciamiento génico de las subunidades: A) Cav1.1; B) Cav1.2; C) Cav1.3; D) Cav2.1; E) Cav2.2; y F) Cav2.3, comparadas con la expresión de las células control (C). Los resultados vienen expresados como media \pm sem (n=3). ***p<0,001, respecto al C.

Los dendriplejos formados con 2 μ M de TGD y 100 nM de uno de los siRNA específicos para el silenciamiento las subunidades Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 (tipo L), Cav2.1 (tipo P/Q), Cav2.2 (tipo N) y Cav2.3 (tipo R) fueron capaces de disminuir de forma significativa y selectiva los niveles de RNAm de las distintas subunidades de CCVD tras 72 horas de incubación (Fig. 36). Tras el silenciamiento selectivo de cada una de estas subunidades, sólo se redujeron los niveles de RNAm de la subunidad deseada, sin observarse ninguna alteración en la expresión de las otras subunidades, mostrando así la selectividad de los tratamientos empleados. Además, los dendriplejos formados con un siRNA diseñado para no silenciar ningún gen conocido (siRNA scramble), no alteraron la expresión de ningún RNAm, confirmando también la selectividad de nuestros tratamientos. Los niveles de expresión de RNAm tras los tratamientos con siRNAs selectivos para cada subunidad de los CCVD (Tabla 5) fueron: $10,2 \pm 5,6\%$ de la subunidad **Cav1.1**; $24,1 \pm 8,1\%$ de la subunidad **Cav1.2**; $14,3 \pm 2,3\%$ de la subunidad **Cav1.3**; $29,7 \pm 6,9\%$ de la subunidad **Cav2.1**; $24,9 \pm 4,5\%$ de la subunidad **Cav2.2**; y $18,2 \pm 1,7\%$ de la subunidad **Cav2.3**, comparados con el grupo de células no tratadas, utilizadas como control y que representan el 100% de la expresión (n=3).

Subunidad de CCVD	Nivel de expresión de RNAm
Control	100 %
Cav1.1	$10,2 \pm 5,6$ %
Cav1.2	$24,1 \pm 8,1$ %
Cav1.3	$14,3 \pm 2,3$ %
Cav2.1	$29,7 \pm 6,9$ %
Cav2.2	$24,9 \pm 4,5$ %
Cav2.3	$18,2 \pm 1,7$ %

Tabla 5.- Porcentaje de los niveles de expresión del RNAm de las distintas subunidades formadoras de los CCVD, tras ser tratadas con dendriplejos conteniendo siRNA selectivo para cada una de ellas, comparadas con las células control. Los datos representan media \pm sem (n=3).

4.- Caracterización del modelo de muerte por VTD en células cromafines bovinas

La producción de ROS se ha asociado con muerte celular en varios modelos de toxicidad neuronal (Mattson y cols, 1995; Seaton y cols., 1998) por lo que estudiamos los cambios producidos por veratridina sobre este parámetro indicador de toxicidad celular.

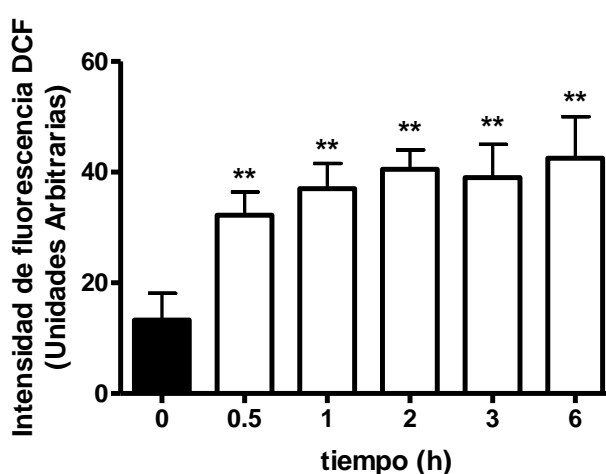


Figura 37.- Curso temporal de la producción de ROS. Se incubaron las células con VTD (100 μ M) durante 0,5, 1, 2, 3 y 6 h, y se estudió el aumento de ROS a las 24 horas. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). **p<0,01, comparado con respecto a las células control (tiempo de exposición=0).

En esta Tesis Doctoral se estudió si en la muerte celular inducida por VTD estaban también involucradas las ROS. Para ello, se expusieron las células cromafines bovinas a 100 μ M de VTD durante distintos tiempos y se estudió la producción de ROS al cabo de 24 horas. Se observó que el estrés oxidativo se produjo tras la exposición a VTD durante 30 minutos, alcanzando a este tiempo un nivel máximo que se conservó tras exposiciones más largas a VTD (Fig. 37).

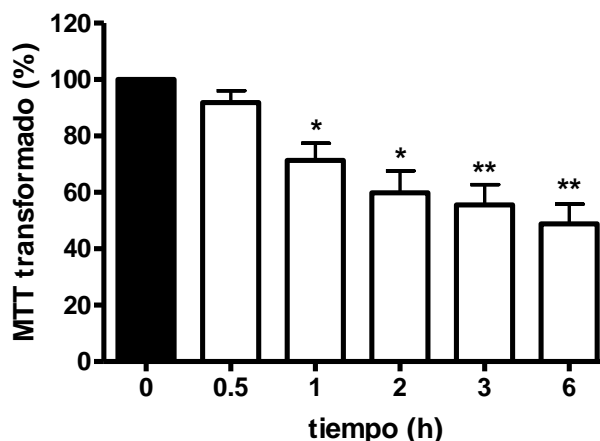


Figura 38.- Toxicidad de VTD sobre la función mitocondrial en las células cromafines bovinas. Se incubaron las células con VTD (100 μ M) durante varios tiempos, y se estudió la reducción de MTT a formazán 24 horas después. La funcionalidad mitocondrial viene expresada en función del porcentaje de formazán producido, siendo el 100% en células control (C). Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). *p<0,05, **p<0,01, comparados con el C (tiempo de exposición=0).

Para producir una disminución de la actividad deshidrogenasa mitocondrial, tomada como un marcador de toxicidad celular, se necesita un tiempo de exposición a VTD algo superior a aquel en el que se produce el incremento de ROS. De este modo, se observó una reducción significativa de la actividad mitocondrial, cuantificada por la transformación de MTT a formazán, tras la exposición a VTD durante 1 hora, y esa reducción fue progresiva al incrementar el tiempo de exposición a VTD (Fig. 38).

Por otro lado, también se estudió si en nuestro modelo de muerte celular inducido por VTD estaba involucrada la vía intrínseca de la apoptosis mediada por caspasas. Se observó que esta vía estaba implicada, ya que se produjo un incremento significativo de la actividad caspasa 3 a partir de una hora de exposición a VTD (Fig. 39), siendo este aumento de actividad caspasa también progresivo al incrementar el tiempo de exposición a VTD. Por último, se evaluó la muerte celular producida por VTD mediante la determinación de la enzima LDH liberada al medio extracelular (Fig. 40). Se observó un

aumento progresivo de la muerte celular a partir de la exposición a VTD durante 2 horas.

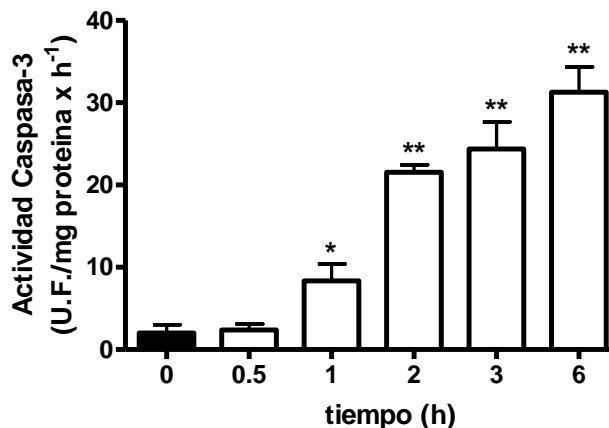


Figura 39.- Curso temporal de la actividad caspasa 3 en células cromafines bovinas. Se midió la actividad caspasa 3 en lisados celulares totales obtenidos de células sin tratar (control) y tratadas con VTD (100 μ M) durante 0,5, 1, 2, 3 y 6 horas. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). *p<0,05, **p<0,01, comparados con respecto al control (tiempo de exposición=0).

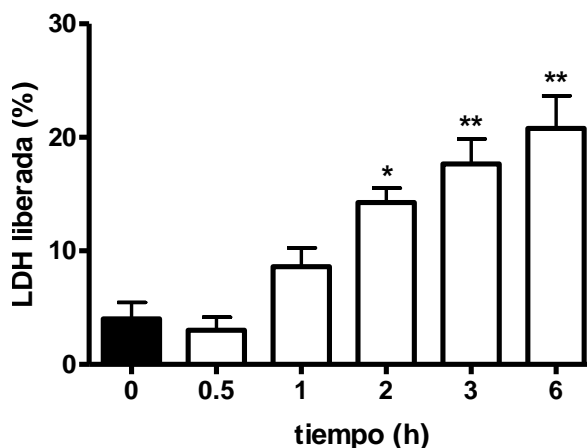


Figura 40.- Evaluación de la muerte celular mediante el ensayo de LDH. Porcentaje de LDH liberada al medio de cultivo por las células cromafines bovinas, tras incubarlas durante distintos tiempos con VTD (100 μ M), y midiendo su efecto 24 horas después. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). *p<0,05, **p<0,01, comparados con respecto a las células control (tiempo de exposición=0).

5.- Efecto de la inhibición selectiva de diversos CCVD sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por VTD

Se evaluaron los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ que se produjeron tras la exposición a 100 μ M de VTD de las células cromafines bovinas, así como el efecto que tuvo sobre dichos cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ la supresión selectiva de varias subunidades α de los diversos tipos de CCVD presentes en las células cromafines. La exposición a VTD (100 μ M) produjo un incremento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$, en forma de picos de sierra (Fig. 41), que concuerda con los efectos descritos previamente para esta toxina (Neher y cols., 1995).

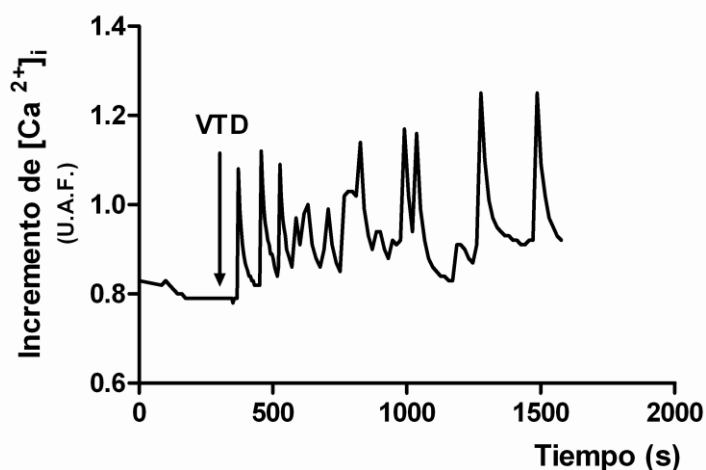


Figura 41.- Incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la exposición a VTD (100 μ M) en células cromafines . Se muestra una figura representativa, característica de los efectos del alcaloide en las células cromafines bovinas.

La inhibición selectiva de la expresión de las subunidades Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 (tipo L), Cav2.1 (tipo P/Q), Cav2.2 (tipo N) y Cav2.3 (tipo R), moduló este incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de forma diferente. Las subunidades Cav1.2 y Cav1.3 contribuyeron de forma significativa, ya que cuando se silenció una de estas subunidades, se observó una disminución en la cantidad de Ca^{2+} que

entra en la célula tras el estímulo con VTD (Fig. 42). Una disminución más pronunciada, en los movimientos de Ca^{2+} intracelular a través de los CCVD, en respuesta al tratamiento con VTD, se detectó al silenciar las subunidades Cav2.1 y Cav2.2. Aunque se observó una disminución mayor en la subunidad Cav2.2, esta diferencia con Cav2.1 no fue estadísticamente significativa (Fig. 42). La eliminación selectiva de las subunidades Cav1.1 y Cav2.3 no modificó los cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular inducidos por VTD indicando su escasa contribución al incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el alcaloide.

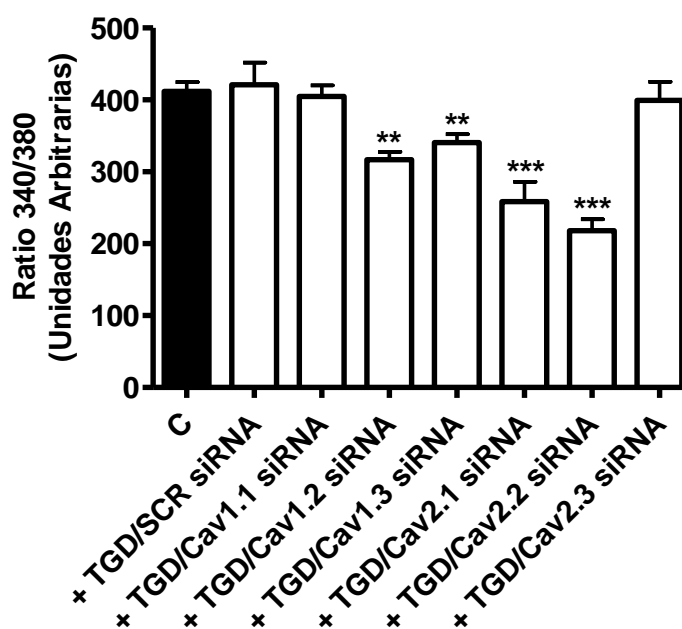


Figura 42.- Estudio del efecto de la inhibición selectiva de CCVD sobre el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por VTD (100 μM). Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=6). **p<0,01, ***p<0,001, respecto a las células control (C).

6.- Efecto de la inhibición selectiva de diversos CCVD sobre la producción de ROS y la actividad caspasa 3 inducida por VTD

La producción de ROS inducida por el tratamiento con VTD (100 μ M) durante 30 minutos, y determinada 24 horas después, se redujo de forma significativa en las células en las que previamente se inhibió la expresión de las subunidades Cav2.2 y Cav2.1 (Fig. 43). Por el contrario, el silenciamiento de las subunidades Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 y Cav2.3 no produjo ningún cambio en este incremento de ROS producido por VTD (Fig. 43).

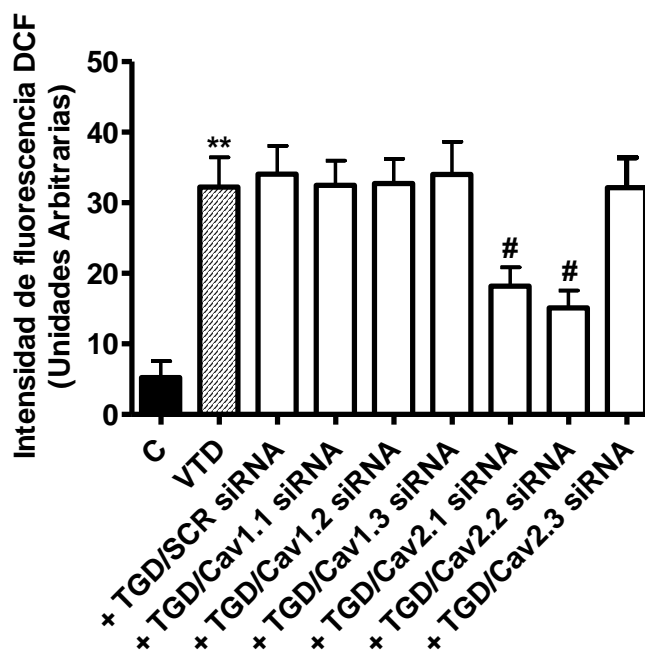


Figura 43.- Estudio del efecto de la inhibición selectiva de las subunidades $\alpha 1$ de los diferentes CCVD sobre la producción de ROS, tras la exposición a VTD (100 μ M, 30 minutos), comparadas con las células control. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). **p<0,01, comparando las células tratadas con VTD (100 μ M) y las control (C); #p<0,05, respecto de las células tratadas sólo con VTD.

También se estudió la actividad caspasa 3 en respuesta a la exposición a VTD (100 μ M) durante 1 hora. La exposición al alcaloide produjo un incremento marcado de la actividad enzimática que se inhibió tras el silenciamiento de las subunidades Cav1.2, Cav1.3, Cav2.1 y Cav2.2. Es llamativo que también fue el silenciamiento de las subunidades Cav2.2 y Cav2.1 las que más redujeron la activación de la caspasa 3, inhibiendo casi completamente los cambios producidos por 100 μ M de VTD (Fig. 44). Aunque se observó un efecto mayor de la subunidad Cav2.2, no fue estadísticamente significativo respecto a la Cav2.1.

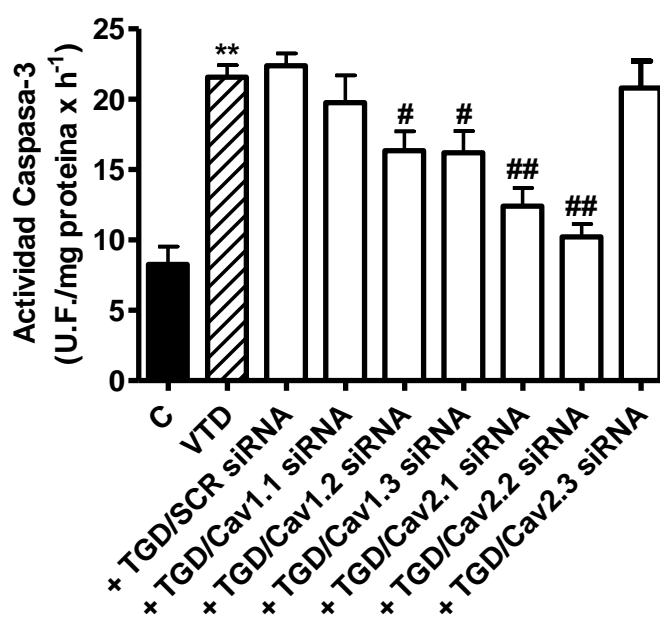


Figura 44.- Estudio del efecto de la inhibición selectiva de las subunidades $\alpha 1$ de los diferentes CCVD sobre la actividad caspasa 3 inducida por VTD (100 μ M, 2h). Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). **p<0,01, comparando las células tratadas con VTD (100 μ M) y las control (C); ##p<0,01, #p<0,05, respecto de las células tratadas sólo con VTD.

7.- Efecto de la inhibición selectiva de CCVD sobre la toxicidad inducida por VTD

Por otra parte, resultados similares se obtuvieron al estudiar la toxicidad inducida por VTD (100 μ M) durante 1 hora determinada mediante la técnica de MTT, aunque en este caso el silenciamiento de las subunidades Cav2.2 y Cav2.1 inhibieron prácticamente en su totalidad la toxicidad inducida por VTD a este nivel (Fig. 45).

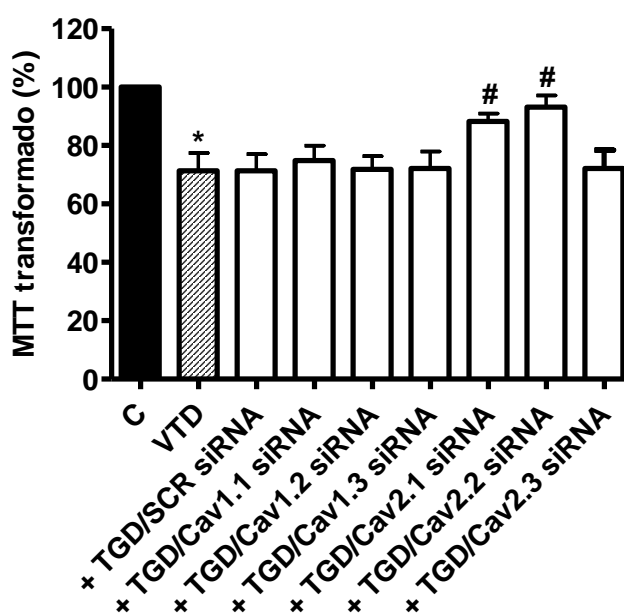


Figura 45.- Estudio del efecto de la inhibición selectiva de las subunidades $\alpha 1$ de los diferentes CCVD sobre la actividad mitocondrial inducida por VTD (100 μ M, 1 hora). Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). *p<0,05, comparando las células tratadas con VTD (100 μ M) y las control (C); #p<0,05, respecto de las células tratadas sólo con VTD.

Por último, cabe destacar que el silenciamiento de las subunidades Cav1.2, Cav2.1 y Cav2.2 de los CCVD redujeron significativamente la muerte celular producida por la exposición a VTD (100 μ M) durante 2 horas y cuantificada 24 horas después mediante ensayo de LDH (Fig. 46).

8.- Efecto de la inhibición selectiva simultánea de las subunidades $\alpha 1$ de los CCVD Cav2.1 y Cav2.2

Puesto que los CCVD que participaron de forma más significativa en la muerte celular inducida por VTD fueron el Cav2.1 (tipo P/Q) y el Cav2.2 (tipo N), el siguiente paso consistió en la inhibición simultánea de las dos subunidades α de dichos CCVD, mediante la formación de un dendriplejo formado por siRNA selectivo para silenciar estas subunidades (2 μ M TGD/100 nM Cav2.1 siRNA/100 nM Cav2.2 siRNA).

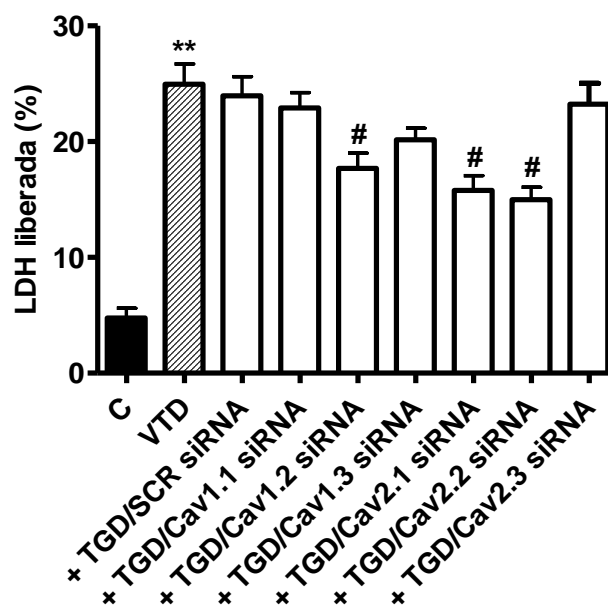


Figura 46.- Estudio del efecto de la inhibición selectiva de las subunidades $\alpha 1$ de los diferentes CCVD sobre la muerte celular inducida por VTD (100 μ M, 2h). La mortalidad celular viene expresada en función del porcentaje de LDH liberada. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). *** $p < 0,001$, comparando las células tratadas con VTD (100 μ M) y las control (C); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, respecto de las células tratadas sólo con VTD.

8.1.- Estudio del silenciamiento génico mediante real time RT-PCR

Se determinaron los niveles de RNAm de los diferentes tipos de CCVD (Figs. 47 y 48), cuantificados mediante real time RT-PCR. Los dendriplejos formados con 2 μ M de TGD y 100 nM de siRNA específico de las subunidades Cav2.1 y Cav2.2 fueron capaces de disminuir de forma significativa y selectiva la expresión génica de ambas subunidades, tras 72 horas de incubación.

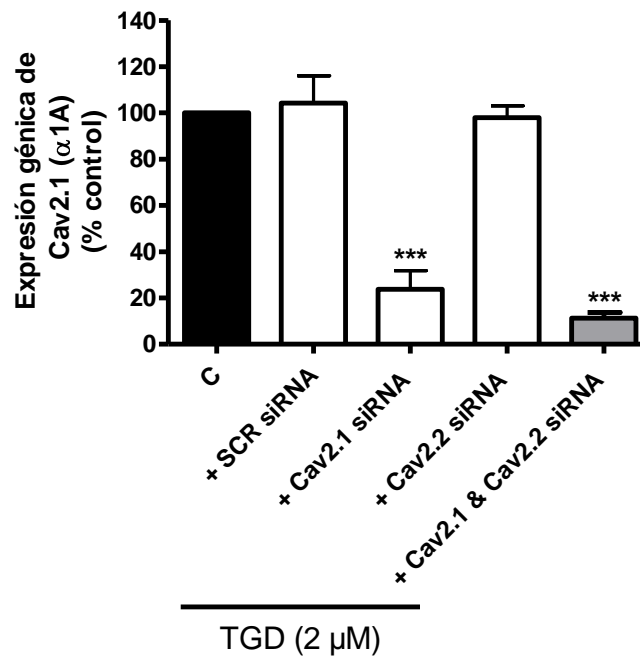


Figura 47.- Estudio del silenciamiento génico de la subunidad Cav2.1 (α 1A). Los valores de RNAm de la subunidad Cav2.1 fueron: $29,7 \pm 6,8\%$ cuando se trató con el dendriplejo TGD/ Cav2.1 siRNA, y $11,3 \pm 2,3\%$ cuando se trató con el dendriplejo TGD/Cav2.1 siRNA/Cav2.2 siRNA. Los resultados vienen expresados como media \pm sem (n=3). ***p<0,001, respecto al control (C).

8.2.- Efecto de la inhibición simultánea de las subunidades α de los CCVD Cav2.1 y Cav2.2 sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por VTD

El silenciamiento simultáneo de las subunidades α de los canales Cav2.1 (tipo P/Q) y Cav2.2 (tipo N), redujo la entrada de Ca^{2+} en las células cromafines, tras la exposición a VTD 100 μ M, alrededor de un 75% (Fig. 49).

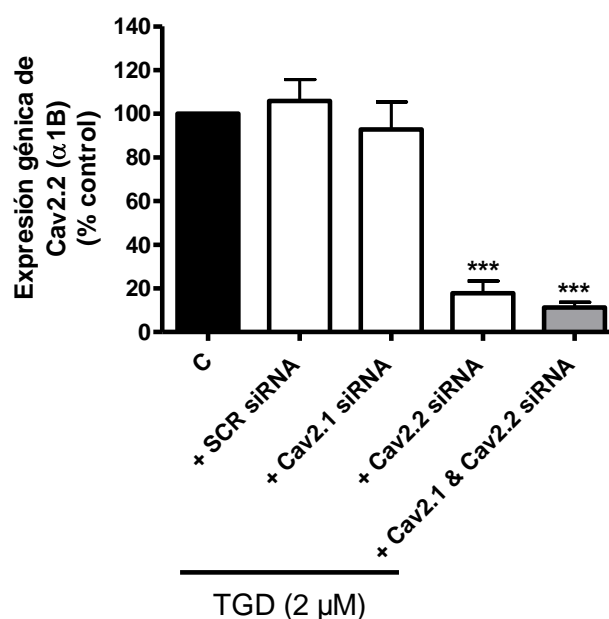
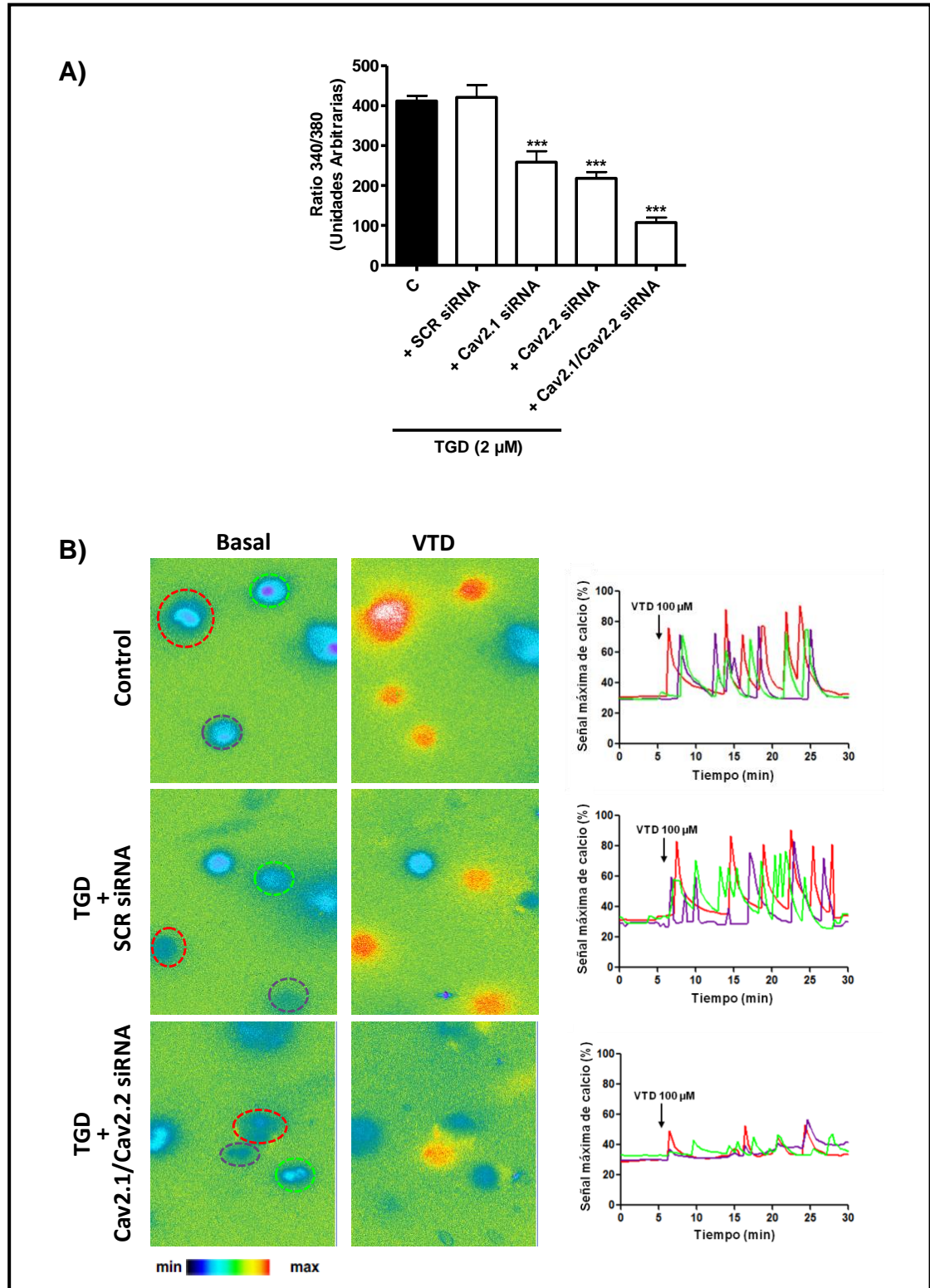


Figura 48.- Estudio del silenciamiento génico de la subunidad Cav2.2 (α 1B). Los valores de RNAm de la subunidad Cav2.2 fueron: $21,1 \pm 2,9\%$ cuando se trató con el dendriplejo TGD/ Cav2.2 siRNA, y $11,3 \pm 2,3\%$ cuando se trató con el dendriplejo TGD/Cav2.1 siRNA/Cav2.2 siRNA. Los resultados vienen expresados como media \pm sem (n=3). ***p<0,001, respecto al control (C).

Al comparar este resultado con los obtenidos al silenciar cada subunidad de los CCVD de forma individual, parece existir un efecto sumatorio del resultado obtenido tras el silenciamiento de las subunidades Cav2.1 y Cav2.2 de forma conjunta.



8.3.- Efecto de la inhibición de las subunidades α de los CCVD Cav2.1 y Cav2.2 sobre la muerte celular inducida por VTD

El silenciamiento simultáneo de las subunidades Cav2.1 y Cav2.2 individualmente redujo significativamente la muerte celular inducida por VTD, estudiada mediante la liberación de LDH, producida por la exposición a VTD (100 μ M) durante 2 horas y medida 24 horas después. La inhibición simultánea de ambas subunidades previno casi en su totalidad la muerte celular inducida por VTD (Figs. 47-49).

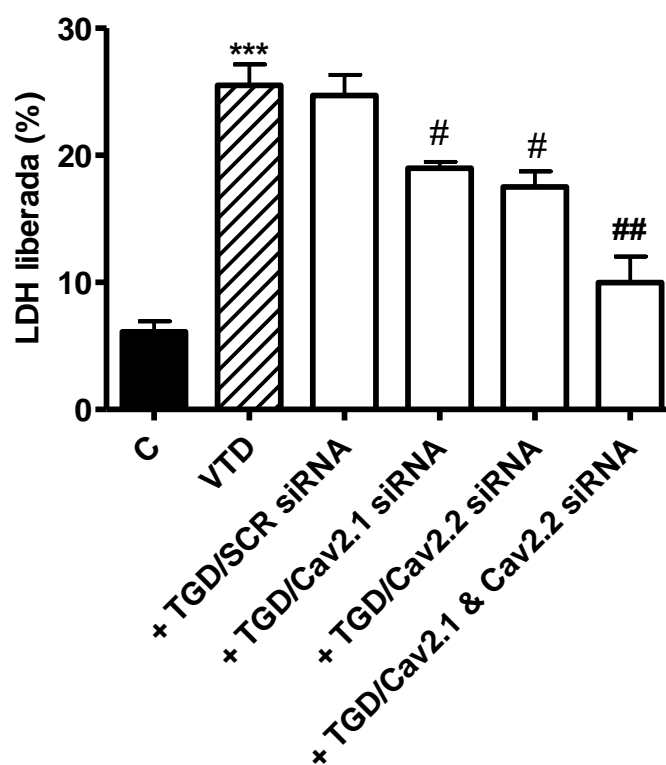


Figura 49.- Estudio del efecto de la inhibición selectiva simultánea de Cav2.1 y Cav2.2 sobre la muerte celular inducida por VTD (100 μ M, 2h). La mortalidad celular viene expresada en función del porcentaje de LDH liberada. Los datos vienen expresados como media \pm sem (n=3). ***p<0,001, comparando las células tratadas con VTD (100 μ M) y las control (C); #p<0,05, ##p<0,01, respecto de las células tratadas sólo con VTD.

DISCUSIÓN

Uno de los problemas fundamentales en la neurociencia consiste en determinar si existe una asociación preferente entre el ión Ca^{2+} que entra por un determinado tipo de canal y la regulación específica de alguna función fisiológica o patológica de las células nerviosas. Hasta ahora, la aproximación a este problema se ha basado en la disección farmacológica de los canales. No obstante, este método tiene la objeción de la inespecificidad de los diversos fármacos y toxinas utilizados para bloquear los diversos tipos de CCVD.

Utilizando células neuroendocrinas, que están consideradas como un buen modelo para estudiar ciertos aspectos de la fisiología neuronal, como son las células cromafines, que expresan varios subtipos de CCVD, la cuestión que hemos intentado resolver es si el Ca^{2+} que entra en las células tras la estimulación con VTD provoca una toxicidad celular asociada a la entrada de Ca^{2+} por un tipo específico de CCVD activado, o si, por el contrario, la toxicidad celular se asocia a la cantidad total de Ca^{2+} que entra en la célula, independientemente de su vía de entrada. En otras palabras, ¿existe una función específica para el Ca^{2+} que entra por un tipo determinado de CCVD? o, por el contrario, no hay función específica para el Ca^{2+} que entra por una vía específica y sus acciones dependen solamente de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ independientemente de cual sea su vía de entrada.

En esta Tesis Doctoral hemos intentado responder a esta pregunta utilizando un nuevo abordaje que consiste en la eliminación selectiva de los diversos tipos de CCVD utilizando siRNA, que es introducido en las células cromafines, utilizando un dendrímero (TGD) como vector no viral.

1.- Caracterización del cultivo de células cromafines bovinas

1.1.- Características morfológicas de las células cromafines

Las células cromafines son células neuroendocrinas que derivan de la cresta neural. Una vez adheridas a las placas, estas células presentan ciertas características inequívocas como su forma redondeada y su tendencia a agregarse entre sí en grupos de varias decenas de células (Fenwick y *cols.*, 1978). Por otro lado, muchos autores han descrito que tras unos días en cultivo, estas células tienden a emitir prolongaciones en formas de neuritas (Unsicker y *cols.*, 1980). Debido a que en este trabajo las células no se utilizaron más allá del quinto día en cultivo, ni se añadieron factores de crecimiento o de diferenciación, nuestros cultivos primarios no presentaron estos signos de diferenciación.

El estudio con microscopía de campo claro, muestra que aunque los cultivos celulares utilizados están compuestos de forma predominante por células cromafines, también existe un pequeño número de células de otros tipos, como células endoteliales y fibroblastos. Estos tipos celulares actúan como soporte de las células cromafines, y favorecen su viabilidad. Podríamos pensar que la presencia de estas células pudiera alterar la validez de los resultados, pero debido al bajo número de células de otro tipo presentes, en este caso, sólo podrían enmascarar sutilmente los datos. Además, se ha comprobado que estos tipos celulares prácticamente no expresan CCVD (Benavides y *cols.*, 2004), por lo que descartamos que pudieran alterar significativamente nuestros resultados.

1.2.- Actividad fisiológica de las células cromafines en cultivo

Se ha descrito en el cultivo de células de la médula adrenal bovina, la existencia de dos poblaciones celulares, una que secreta preferentemente noradrenalina y la otra adrenalina (Moro y *cols.*, 1990). En este estudio, la detección de estas CAs la hemos realizado utilizando la técnica de HPLC de

fase reversa acoplada a un detector electroquímico siguiendo el método empleado en nuestro grupo en estudios previos (Calvo y cols., 1995). No se ha descrito una diferencia significativa en la dotación de CCVD entre ambos tipos celulares, por lo que no parece que la presencia de ambos tipos celulares pueda afectar a los resultados presentados en esta Tesis Doctoral. A pesar de ello, hemos validado nuestro cultivo de células cromafines bovinas como modelo neurosecretor, mediante la determinación por HPLC de la cantidad de adrenalina y noradrenalina contenida en las células. En este sentido, hemos determinado que en nuestro cultivo existe aproximadamente un 75% de células cromafines que secretan noradrenalina y un 25% adrenalina. La proporción es inversa a la descrita en algunos artículos para células cromafines bovinas, que proponen una proporción 80:20 de adrenalina:noradrenalina (Craviso y cols., 2003), aunque este porcentaje puede variar significativamente, dependiendo del método de aislamiento y de la purificación en gradientes de Percoll[®] (Moro y cols., 1990). Adicionalmente, otros artículos han mostrado que, dependiendo de la región que se aísle de la médula adrenal bovina, aumenta la proporción de células noradrenérgicas frente a las adrenérgicas (García-Palomero y cols., 2001).

Hemos observado que las células son funcionalmente activas, puesto que liberan CAs en respuesta a la estimulación con elevadas concentraciones de un agente despolarizante como es el K⁺ extracelular, mostrando una mayor secreción de noradrenalina que de adrenalina, en concordancia con otros estudios (Calvo y cols., 1995). De esta forma, hemos validado el modelo a utilizar, comprobando que es funcionalmente activo y que no se observan alteraciones de la maquinaria responsable del proceso de secreción, en el que, como se ha comprobado previamente, participan en buena medida los CCVD (Ceña y cols., 1983) aquí estudiados.

2.- Empleo del alcaloide VTD como modelo de muerte en células cromafines bovinas

El alcaloide VTD es conocido por incrementar la permeabilidad del ión Na^+ a través de los canales de Na^+ voltaje-dependientes (Ohta y cols., 1973; Hille, 1992). Esto sugiere que las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por VTD comienzan por la despolarización de la membrana, como consecuencia del incremento de la permeabilidad al ión Na^+ antes mencionada. Esta despolarización modifica el potencial de membrana hacia valores más próximos a la activación de los CCVD, que serían los responsables de la entrada de Ca^{2+} tal y como ha sido descrito por nuestro grupo y por otros (Kilpatrick y cols., 1982; Jordán y cols., 2000; García y cols., 2006). De hecho, es conocido que las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por VTD se previenen por la retirada del Ca^{2+} externo (Jordán y cols., 2000), mediante bloqueo de los canales de Na^+ con TTX, o mediante el bloqueo de los CCVD con una mezcla de toxinas y DHPs (Pauwels y cols., 1989; López y cols., 1994; Maroto y cols., 1994, 1996; Cano-Abad y cols., 1998; Novalbos y cols., 1999). Dependiendo de la concentración y el tiempo de exposición, la VTD puede promover en células cromafines la secreción de CAs (Cheek y cols., 1993a, b; Finnegan y Wightman, 1995) o procesos tóxicos que pueden terminar desencadenando, si este estímulo es lo suficientemente agresivo, la muerte celular (Jordán y cols., 2000).

En esta Tesis Doctoral se han estudiado estos procesos tóxicos producidos por la exposición a VTD, que están relacionados con procesos similares observados durante la muerte neuronal inducida por isquemia y en enfermedades neurodegenerativas (Takei y cols., 1989; Ashley, 1986).

2.1.- Características de las corrientes de Ca^{2+} generadas por VTD en células cromafines bovinas

El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es una señal de transducción para muchos procesos fisiológicos. En un buen número de células estudiadas, dicho

cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a VTD, parece ser oscilatorio antes de estabilizarse (Tsien y Tsien, 1990). Este comportamiento tiene ventajas a la hora de observar el desarrollo de las respuestas fisiológicas, ya que son fácilmente observables en términos de frecuencia o duración de las oscilaciones de Ca^{2+} , así como en términos de amplitud del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Tras la observación de los procesos responsables de la generación de las oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, se han destacado dos mecanismos: por una parte, las oscilaciones aumentan debido a cambios periódicos en el potencial de membrana y la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+} , el cual entra a través de receptores de membrana (Gorman y Thomas, 1978; Schlegel y cols., 1987), y por otra, un intercambio dinámico de Ca^{2+} entre el citosol y los depósitos intracelulares (Cuthbertson y Cobbold, 1986; Tsien y Tsien, 1990). En algunos casos, ambos mecanismos pueden cooperar, la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática dispara la liberación masiva de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, lo que amplifica la $[Ca^{2+}]_i$ (Friel y Tsien, 1992).

En esta Tesis Doctoral, hemos estudiado la contribución relativa de los CCVD a la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, en respuesta a VTD. Estudios previos concluyen que la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares no participa en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ tras el estímulo con VTD (Garaschuk y cols., 1997), ya que el tratamiento con fármacos como thapsigargina y ryanodina no afectan de forma significativa a éstas oscilaciones inducidas por VTD en células cromafines bovinas (López y cols., 1995). Una conclusión similar se ha obtenido en células de hígado de rata (McNulty y Taylor, 1993).

Se conoce que la VTD despolariza las células excitables mediante la prevención de la inactivación de los canales de Na^+ voltaje-dependientes (Catterall y Coppersmith, 1981; López y cols., 1995), manteniéndolos abiertos durante largos períodos de tiempo. Este efecto despolarizante es oscilatorio y provoca un incremento cíclico en el flujo de Na^+ y Ca^{2+} (Amy y Kirshner, 1982), el cual induce, en condiciones fisiológicas, la liberación de CAs de las

células cromafines (Ceña y cols., 1983; Sihra y cols., 1984; Yokoo y cols., 1998). Por otro lado, se conoce que estas oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ provocadas por elevadas concentraciones de VTD son duraderas y no desaparecen tras la eliminación del fármaco, interpretándose como una sobrecarga de Ca^{2+} que explica el conocido efecto citotóxico de la VTD en neuronas y células cromafines (Maroto y cols., 1994).

2.2.- Estudio de los efectos tóxicos inducidos por VTD en células cromafines bovinas

En anteriores estudios se han investigado los mecanismos que, activados por la VTD, inducen la muerte en células cromafines bovinas (Maroto y cols., 1994, 1996; Jordán y cols., 2000). En la presente Tesis Doctoral, hemos confirmado la acción neurotóxica producida por la exposición a VTD y descrito algunos de los mecanismos activados en células cromafines bovinas durante la toxicidad inducida por VTD. Así, algunos de los efectos tóxicos que promueve, en las células cromafines, la exposición a elevadas concentraciones de VTD son: 1) aumento del estrés oxidativo; 2) disfunción mitocondrial; 3) activación de la vía de las caspasas; y 4) muerte celular.

La secuencia propuesta de la alteración de los mecanismos homeostáticos de Na^+ y Ca^{2+} , que llevaría a la muerte de las células cromafines tratadas con VTD y el mecanismo de citoprotección ofrecido por la inhibición selectiva de diferentes CCVD sería el siguiente: 1) la VTD retrasa la inactivación de los canales de Na^+ voltaje-dependientes, aumentando la entrada de Na^+ al interior celular a través estos canales (Ota y cols., 1973; Kilpatrick y cols., 1982); 2) esto provoca la despolarización celular y la consiguiente apertura de los CCVD (Lopez y cols., 1995; Jordán y cols., 2000), aumentando la $[Ca^{2+}]_i$; 3) la mitocondria detecta el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y se incrementa la actividad de la bomba Na^+/Ca^{2+} mitocondrial (Montero y cols., 2000), que contribuye a generar grandes y largas oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ (Maroto y cols., 1994, 1996; Novalbos y cols., 1999); 4) esta sobrecarga de Ca^{2+} citosólico produce sobreproducción de ROS; 5) un desequilibrio mitocondrial; 6) inicio de

procesos de muerte celular caracterizados por activación de proteasas, plegamiento proteico y colapso energético y 7) finalmente, la muerte celular (Sedlak y Snyder, 2006). Por otro lado, el bloqueo selectivo de los CCVD conlleva una disminución en la sobrecarga de Ca^{2+} citoplasmático inicial, moderando los rápidos cambios mitocondriales y ejerciendo citoprotección frente a la toxicidad por VTD. Las similitudes entre estos mecanismos activados durante la muerte celular de las células cromafines y aquellos responsables de la muerte excitotóxica neuronal (Pettmann y Henderson, 1998) sugieren que las células cromafines podrían ser un modelo útil para estudiar los mecanismos moleculares activados durante la muerte neuronal.

Los resultados de este estudio han demostrado que la entrada de Ca^{2+} a través de cualquier subtipo de CCVD podría tener efectos negativos en las células, pero algunos subtipos de CCVD contribuyen más que otros a este proceso de entrada de Ca^{2+} en respuesta a VTD. Los CCVD están distribuidos de forma no homogénea en la célula cromafín, como demuestra la generación de gradientes de Ca^{2+} submembranales en respuesta a diferentes estímulos despolarizantes (Fernández y cols., 1995). Esta distribución específica plantea una pregunta relevante en temas de fisiología neuronal y que puede ser contestada utilizando un modelo como la célula cromafín bovina: ¿existe una función específica asociada al Ca^{2+} que entra por un tipo determinado de CCVD o, por el contrario, no hay selectividad en la función de cada uno de los subtipos de CCVD, a pesar de su localización no homogénea en la membrana de la célula cromafín?

Estos resultados podrían ser evaluados en el contexto de la búsqueda de fármacos capaces de ofrecer protección frente a daños excitotóxicos neuronales, como se ha propuesto para otros fármacos con efectos inhibitorios en la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (Maroto y cols., 1996). De hecho, se ha propuesto que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el mecanismo común que media en la neurotoxicidad inducida por diferentes estímulos como hipoxia cerebral, epilepsia y enfermedades neurodegenerativas (Choi, 1988).

2.2.1.- Implicación del estrés oxidativo en la toxicidad inducida por VTD

Un aspecto muy interesante de la biología de las células cromafines consiste en la activación de mecanismos comunes a las neuronas durante procesos tóxicos, permitiendo así el uso de las células cromafines como un modelo válido para el estudio de los mecanismos activados durante la muerte neuronal. Uno de estos mecanismos moleculares comunes activado durante la toxicidad inducida por VTD es el estrés oxidativo. Nuestros datos, confirmando resultados descritos previamente (Jordán y cols., 2000), muestran que un aumento en la producción de ROS es uno de los primeros mecanismos que se produce en las células cromafines como consecuencia del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. De hecho, estudios previos han demostrado que la producción de ROS inducida por VTD, es un paso clave en el proceso de muerte celular (Jordán y cols., 2000). Por otro lado, también se han estudiado los efectos de paraquat (un generador de ROS) y H_2O_2 , mostrando que son también capaces de inducir la fragmentación del DNA y la consiguiente muerte en células cromafines (Jordán y cols., 2002). Esto sugiere que la VTD induce una cascada secuencial que empieza con la sobreproducción de ROS, y continúa con fallo mitocondrial, apoptosis y muerte celular. Nuestros resultados parecen correlacionarse perfectamente con esta hipótesis, ya que este proceso se produce tras 30 minutos de exposición a VTD.

Estudios anteriores que también se correlacionan con nuestros resultados, han comprobado que el MnTBAP, que degrada catalíticamente las ROS, posee un efecto protector sobre la toxicidad inducida por el aminoácido excitotóxico N-Metil-D-Aspártico (NMDA) en cultivos de células neuronales (Faulkner y cols., 1994) y, también, en la toxicidad del tratamiento con VTD en células cromafines (Jordán y cols., 2002). Por otro lado, aunque se considera a la mitocondria como fuente principal de ROS, también es posible que, tras la exposición a VTD, exista cierta actividad xantina-oxidasa activada por el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, que puede también contribuir a la generación de las ROS (Jordán y cols., 2000). De este modo, es probable que diversas vías fisiopatológicas relacionadas con los radicales libres estén implicadas en la

muerte inducida por VTD. Esta nueva hipótesis también se relaciona con resultados de nuestro estudio, donde se muestra un efecto más temprano de VTD induciendo la producción de ROS (tras 30 minutos de exposición) que sobre la disminución de la actividad mitocondrial (tras 1 hora de exposición a VTD).

2.2.2.- *Disfunción mitocondrial en la toxicidad inducida por VTD*

Como se ha indicado en el apartado anterior, se piensa que las mitocondrias son la principal fuente de ROS en las células, y diversos estudios sugieren que esta organela parece participar en la patología celular a través de la activación de un canal localizado en su membrana interna, denominado poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) (Hirsch y cols., 1998; Miller, 1998). La apertura de este poro está favorecida por varios factores como la despolarización y el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. En algunos casos, la activación del PTP parece ser irreversible y tiene consecuencias importantes sobre la célula, estando asociada con un “hinchamiento” de la mitocondria y la liberación de moléculas al citoplasma, como el factor de inducción de apoptosis (AIF) y citocromo C, que promueve la vía apoptótica y la muerte celular. Esta respuesta parece ser un evento temprano en la activación de la muerte en muchos tipos celulares, modulando la fase de ejecución de la apoptosis, a través de la vía de las caspasas (Kroemer y cols., 1997; Bernardi y cols., 1999).

Nuestros datos muestran que la VTD afecta a la función mitocondrial en las células cromafines bovinas, como demuestra la disminución de la capacidad de reducir MTT tras 1 hora de exposición a VTD. Estos datos concuerdan con estudios previos de nuestro grupo, en los que se ha visto que la sobreproducción de ROS en respuesta a VTD es capaz de disparar mecanismos implicados en la muerte celular, incluyendo en la activación de caspasas (Jordán y cols., 2002). Además, también se ha observado que VTD induce la liberación del citocromo C de la mitocondria, de forma similar a como lo causan otros estímulos nocivos que producen una sobrecarga de Ca^{2+} como, por ejemplo, los estímulos excitotóxicos (Gunter y Gunter, 1994),

y que esta acción es antagonizada por la Vitamina E, un conocido agente antioxidante (Jordán y cols., 2002).

En nuestro trabajo, los resultados sugieren que el estrés oxidativo generado por VTD es capaz de disparar el proceso apoptótico dependiente de mitocondria. Así, VTD induce de forma muy rápida la producción de ROS y, prácticamente al mismo tiempo, la actividad caspasa 3 puede detectarse en el lisado celular. Por otro lado, este proceso es similar al acontecido en cultivos neuronales expuestos a VTD, ya que también se ha observado previamente que distintos compuestos como la vitamina E, la ciclosporina A, MnTBAP y la catalasa previenen la liberación del citocromo C y la activación de la cascada enzimática de las caspasas inducida por VTD (Jordán y cols., 2002). Estos resultados reafirman el uso de células cromafines como un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la muerte neuronal.

2.2.3.- Activación de la vía apoptótica inducida por VTD

Un efector final en la vía de muerte celular programada o apoptosis es la activación de un tipo de proteasas: las caspasas (Chen y cols., 1998; Pettmann y Henderson, 1998). Nuestros resultados se correlacionan con otros estudios donde también se ha mostrado que este mecanismo parece estar activado en células cromafines expuestas a VTD. En estos estudios se ha observado que existe un incremento en la activación de caspasas, dependiente del tiempo de exposición a VTD. Además, la activación de las caspasas inducidas por VTD se inhibió mediante el uso de TTX o la retirada del ión Ca^{2+} del medio extracelular. Otra similitud con las neuronas es el hecho de que la sobrecarga de Ca^{2+} produce muerte celular en las células cromafines bovinas (Itano y Nomura, 1995; Jänicke y cols., 1998; Jordán y cols., 2000), siendo parte de esta muerte independiente de la vía de las caspasas, ya que inhibidores de estas proteasas sólo previnieron parcialmente la toxicidad inducida por VTD (Jordán y cols., 2002).

Nuestros datos muestran que tras el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, existe un incremento de la producción de ROS y una significativa disfunción mitocondrial que produciría la activación de las caspasas.

Estudios previos sugieren que la secuencia de acontecimientos en la muerte de las células cromafines inducida por VTD es similar al observado en la muerte neuronal por excitotoxicidad, donde la entrada de Ca^{2+} se produce por sobreactivación de receptores de glutamato (Aguado y cols., 1997). Ambos estímulos nocivos inician una cascada de acontecimientos caracterizada por la pérdida de homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$, la producción de ROS, la disminución de la actividad mitocondrial, la activación de procesos pro-apoptóticos y, finalmente, la muerte celular. En este sentido, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial han sido también extensamente relacionados con la enfermedad de Alzheimer y otras muchas patologías neurodegenerativas (Ansari y cols., 2006; Lin y Beal, 2006; Trushina y McMurray, 2007), mostrándose resultados satisfactorios sobre la neuroprotección que produce el tratamiento con diferentes inhibidores de la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (Valero y cols., 2009) e incluso con inhibidores de CCVD (Valentino y cols., 1993; Small y cols., 1997).

3.- TGD es un vector no-viral útil para transfectar células cromafines bovinas con siRNA sin producir toxicidad, y para silenciar la expresión de varias subunidades de CCVD

En los últimos años, se ha descrito un nuevo mecanismo que las células utilizan para regular la expresión génica: el siRNA. Dicho mecanismo está basado en pequeños fragmentos de RNA de doble cadena que pueden unirse y neutralizar específicamente moléculas de RNAm, evitando que las células realicen la traducción de ese RNAm en su correspondiente proteína.

A principios del año 2002, un artículo publicado en *Nature* de Tomas Tuschl y cols., del Instituto Max Planck de Química-Biofísica de Gottingen (Alemania) (Tuschl y cols., 2002) mostró que pequeñas moléculas de RNAi (siRNA) podían bloquear la producción de proteínas en células de mamíferos. Mediante el uso de moléculas de siRNA, se pueden corregir las alteraciones presentes en las células dañadas, por lo que el uso de esta tecnología presenta un gran potencial para el tratamiento de diversas patologías que actualmente carecen de un tratamiento efectivo. No obstante, uno de los grandes problemas que impide el uso generalizado de esta tecnología consiste en la dificultad que tiene el siRNA para atravesar barreras celulares y, por tanto, entrar en la célula. Para resolver este problema, se utilizan, entre otras aproximaciones, los vectores no virales.

La entrega del siRNA al interior celular mediada por vectores no virales se consigue tras superar diferentes barreras: membrana celular, el interior celular, especialmente los lisosomas, y liberar el material genético que transportan en el citoplasma. Afortunadamente, la superficie de los nanomateriales puede diseñarse para conseguir propiedades físicas y/o biológicas específicas que permitan la interacción con la membrana citoplasmática, permitiendo su captación. Los vectores no virales son capaces de entrar en este tipo de células mediante diferentes vías de internalización de forma simultánea. Estas vías incluyen tanto la fagocitosis, como la pinocitosis. Aunque alguna de estas vías pueda llevar a la degradación de la

NP y su carga, esta diversidad de vías de entrada hace que el uso de NPs como moléculas terapéuticas en células neuronales sea posible.

Una vez dentro de la célula, el mayor obstáculo para la liberación del material génico en los distintos tipos celulares son probablemente los lisosomas. El ambiente lisosomal, que se caracteriza por un bajo pH y la presencia de enzimas hidrolíticas, puede degradar rápidamente un amplio rango de NPs y sus cargos, incluyendo DNA, RNA, proteínas y agentes terapéuticos. Por ello, el escape lisosomal es considerado como el paso más limitante en la efectividad de las NPs (Suk y cols., 2006). Algunos estudios indican que las cargas positivas en la superficie de las NPs son críticas para la entrada en la célula y el escape lisosomal, y que modificaciones en la superficie como la adición de arginina son importantes en la eficiencia de escape (El-Sayed y cols., 2008).

Básicamente, cualquier gen cuya secuencia sea conocida puede ser la diana de la secuencia complementaria de una molécula de siRNA correctamente diseñada. Sin embargo, se necesita un vector como el utilizado en esta Tesis Doctoral que presente: 1) solubilidad aceptable en agua, 2) reducida toxicidad, 3) capacidad de unión del material genético, 4) posibilidad de liberar el siRNA intacto en condiciones intracelulares, 5) que lo proteja de la degradación enzimática acontecida en los fluidos corporales y medios de cultivo, y 6) capacidad de transportar al interior celular la cantidad suficiente de siRNA para bloquear prácticamente la totalidad de la expresión del gen diana.

3.1.- Toxicidad de TGD en células cromafines bovinas

Ciertamente, existen dudas en relación con la toxicidad causada por las NPs en células post-mitóticas, uno de sus mayores *hándicaps* para ser utilizadas eficientemente en estudios de terapia génica. Sin embargo, los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad con TGD muestran una baja toxicidad a las concentraciones necesarias para conseguir resultados efectivos en células cromafines bovinas.

En células cromafines bovinas, no se observó ninguna toxicidad a concentraciones iguales o inferiores a 2 μM de TGD tras la incubación durante 24-72 horas, empezando a mostrar una toxicidad significativa a partir de la incubación durante 48-72 horas con dosis de TGD de 6 y 8 μM . Estos efectos tóxicos, son similares a los obtenidos con este mismo dendrímero en otros cultivos de células post-mitóticas. Por ejemplo, TGD no mostró, en neuronas granulares de cerebelo de rata, signos de toxicidad medidos por ensayos de MTT y LDH a concentraciones de 3 μM tras una incubación de 72 horas (Rodrigo y *cols.*, 2011). Por otro lado, estudios en neuronas corticales de rata mostraron que esta dosis máxima no tóxica es de 4 μM para periodos de incubación de 72 horas (Pérez-Carrión y *cols.*, 2012).

3.2.- Transfección de siRNA utilizando TGD como vector no viral

Este estudio es el primero que utiliza una NP como vector no viral para transportar siRNA al interior de células cromafines bovinas. Aunque la vía de internalización exacta de estos dendriplejos aún no haya sido determinada, lo más probable es que esté mediada por endocitosis como en la mayoría de los tipos celulares, terminando en su degradación en los lisosomas, si no existe un mecanismo eficaz para escapar de esta vía de degradación. En los datos obtenidos este estudio, podemos observar una elevada transfección con un marcado silenciamiento génico, lo que muestra que TGD posee las características necesarias para escapar de esta vía degradativa y así, ser una herramienta útil en terapia génica.

En células post-mitóticas, debido a la baja eficiencia de transfección obtenida inicialmente con los vectores no virales, la estrategia inicial para introducir material genético se basó en el uso de vectores virales. En este sentido, los vectores no virales utilizados para introducir material genético en células eucarióticas, como la coprecipitación con fosfato cálcico y los métodos basados en el uso de compuestos con un elevado peso molecular, como el dextrano, mostraron una elevada variabilidad en la eficiencia de transfección,

dependiendo del tipo celular, y una elevada toxicidad en cultivos primarios (Guerra-Crespo y cols., 2003; Dalby y cols., 2004).

La eficiencia de transfección observada en células post-mitóticas utilizando lípidos catiónicos es muy baja, siendo la máxima obtenida de un 25% con Lipofectamine® en neuronas corticales de rata (Dalby y cols., 2004). En NPs derivadas de PEI, la literatura muestra unos niveles muy bajos, que oscilan desde un 1% en células granulares de cerebelo hasta un 20% en neuronas simpáticas de los ganglios superiores cervicales (Lambert y cols., 1996). En los últimos años, el estudio del uso de nanotubos de carbono combinados con dendrones de PAMAM, ha mostrado un aumento en la eficiencia de transfección de hasta un 50% en neuronas granulares de cerebelo de rata (Herrero y cols., 2009).

Sin embargo, TGD ha mostrado una eficiencia de transfección de siRNA en este tipo de células similar a la obtenida con vectores virales, consiguiendo aproximadamente un 80% de inhibición en los niveles de RNAm específicos, lo que es considerado como suficiente para llevar a cabo los estudios de “ausencia de función”. En la presente Tesis Doctoral, mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, se ha detectado un transporte efectivo de los siRNA al interior celular utilizando TGD como vector no viral. En este sentido, a las 24 horas se estimó un 70% de células cromafines habían incorporado los dendriplejos, aumentando a prácticamente el 100% a las 48-72 horas post-transfección, utilizando dosis de 2 μ M de TGD y 100 nM de FAM-siRNA. Estos niveles de transfección son significativamente mayores que los mostrados por otros tipos de NPs en células post-mitóticas. Por ejemplo, utilizando un dendrímero PAMAM de cuarta generación se consiguió una transfección del 25-40% en cultivos primarios de neuronas corticales (Kim y cols., 2006). Más recientemente, sí que se ha visto que modificaciones de éstos dendrímeros PAMAM pueden incrementar éstos niveles de transfección hasta los mostrados con TGD en células post-mitóticas (Kim y cols., 2010). De hecho, estudios previos también muestran que TGD es capaz de incorporarse desde un 30% de neuronas granulares de cerebelo a las 24

horas, hasta casi un 80% a las 48 horas, llegando prácticamente al 100% de las neuronas a las 72 horas post-transfección (Rodrigo y cols., 2011). Estas eficiencias de transfección fueron similares en otro estudio en el que se utilizaron neuronas corticales de rata (Pérez-Carrión y cols., 2012).

3.3.- Capacidad de interacción TGD/siRNA

Los complejos se formaron a diferentes ratios N/P entre TGD y el siRNA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras ser cargados en un gel de agarosa, se vio que un ratio N/P de 3,5 era suficiente para producir un retardo completo del siRNA. Comparado con otras NPs, el número de cargas positivas de la NP necesarias para acoplar cada carga negativa del siRNA, es menor para TGD que para dendrímeros PAMAM de primera generación o modificados con PEG, que necesitan un ratio N/P de 45 y 15, respectivamente, para el retardo completo del siRNA (Kim y cols., 2008; Monteagudo y cols., 2012). Por el contrario, parece ser muy similar al ratio N/P necesario por otro tipo de NPs poliméricas como algunas basadas en sorbitol (Islam y cols., 2012), por NPs compuestas por combinación de nanocuernos de carbono/PAMAM (Pérez-Martínez y cols., 2012c), o por NPs basadas en PEI (Chen y cols., 2012).

La capacidad de proteger el siRNA de las RNAsas es de vital importancia para que el siRNA ejerza su efecto, evitando su degradación antes de ser internalizado en las células (Mao y cols., 2006). Por eso se realiza el estudio de protección de RNAsas, que nos permite comprobar la resistencia del complejo frente a la degradación por parte de estas enzimas. Con este estudio se pudo comprobar que el siRNA libre es degradado completamente en presencia de 0,25% de RNAsas, mientras que el siRNA unido a TGD no es degradado. Dada la rapidez con la que se degrada el siRNA en contacto con las RNAsas presentes, tanto en el ambiente como en los fluidos biológicos, esta capacidad de ciertas NPs parece esencial si se quieren emplear para transportar siRNA al interior celular, tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, la mayoría de las NPs empleadas para aplicaciones biológicas parecen poseer esta capacidad en mayor o menor grado.

3.4.- Uso de técnicas de RNAi para inhibir selectivamente los CCVD en células cromafines bovinas

El objetivo de utilizar siRNA en el estudio funcional de los CCVD es posibilitar el estudio sobre el papel que juega cada tipo de CCVD en diversas situaciones fisiológicas y patológicas, un tema que durante mucho tiempo ha supuesto un reto no resuelto. La tecnología del RNAi ha surgido como una buena alternativa para el estudio del papel de ciertas proteínas en los mecanismos fisiológicos y patológicos de la célula, porque es específico, no permite el desarrollo de mecanismos compensatorios y, además de ser más barato, requiere menos tiempo que otras alternativas como los ratones *knock out*.

El uso de vectores no virales en terapia génica ha sido especialmente utilizado en líneas tumorales (Liu y *cols.*, 2009) y células sanguíneas (Weber y *cols.*, 2008), ya que las células post-mitóticas son muy difíciles de transfectar. Hasta el momento, muy pocos estudios se han llevado a cabo para silenciar un gen utilizando siRNA internalizado mediante un vector viral o no viral en cultivos primarios de células cromafines. La mayoría de estos estudios se han realizado en células tumorales PC12 de feocromocitoma de rata, utilizando vectores no virales comerciales como Lipofectamine LTX[®] y Lipofectamine2000[®] (Wen y *cols.*, 2008; Han y *cols.*, 2008), Superfect[®] (Mahapatra y *cols.*, 2008), o utilizando vectores virales (Osborne y *cols.*, 2008; Zeniou-Meyer y *cols.*, 2007). No obstante, las líneas tumorales son relativamente fáciles de transfectar, y no siempre son un modelo adecuado para estudiar la fisiología de las células de las que se originan. Por el contrario, en células neuroendocrinas no tumorales (células cromafines) como las utilizadas en esta Tesis Doctoral, sólo se han realizado estudios con adenovirus recombinantes (Park y *cols.*, 2006).

Con respecto al empleo de NPs, en particular de dendrímeros, para terapia génica, se ha conseguido salvar su principal inconveniente, su escasa eficiencia de transfección, gracias a que los dendrímeros ofrecen una gran flexibilidad en su diseño (Boas y *cols.*, 2004). Las variaciones en tamaño,

generación y densidad de carga permiten optimizar cada NP para cada función específica (Zuhorn y cols., 2007; Paleos y cols., 2007; Svenson y cols., 2007). En este sentido, TGD ha demostrado ser útil para alcanzar una inhibición selectiva del 70% o superior de la expresión de las subunidades $\alpha 1$ de los CCVD presentes en células cromafines bovinas. Además, TGD también ha mostrado resultados satisfactorios disminuyendo la expresión de genes como cofilina-1 en células granulares de cerebelo hasta aproximadamente un 20% de los niveles control sin signos aparentes de toxicidad (Rodrigo y cols., 2011). Otros genes silenciados con este mismo dendrímero han sido, en neuronas corticales de rata, los de cofilina-1 y SSH-1L (Posadas y cols., 2012) y el de beclina-1 (Pérez-Carrión y cols., 2012), con niveles de inhibición similares a los obtenidos en el presente estudio en células post-mitóticas.

4.- Papel que desempeñan cada uno de los CCVD en procesos de toxicidad inducidos por VTD, y su correlación con la $[Ca^{2+}]_i$

Desde que se describieron varios subtipos de CCVD en neuronas (Swandulla y cols., 1991; Tsien y cols., 1991; Olivera y cols., 1994), y en las células cromafines de la médula adrenal (Benavides y cols., 2004; García y cols., 2006;), la pregunta fundamental por la que se ha realizado esta Tesis Doctoral, consiste en explorar si existe una especialización de cada subtipo de CCVD en una o varias funciones celulares o, dicho en otras palabras, si el Ca^{2+} que entra por cada subtipo posee un papel selectivo en el control de distintas funciones fisiológicas. Para ello, estudiamos el papel que desempeña cada tipo de CCVD en la muerte inducida por VTD.

En neuronas, esto parece ser más evidente, ya que existe una segregación geográfica de los distintos subtipos de CCVD, lo que facilita su especialización en funciones específicas (Rosa y cols., 2007). Se ha observado que los CCVD tipo N (Cav2.2) y P/Q (Cav2.1) son predominantes a lo largo de las dendritas apicales y en las terminaciones axonales que sinaptan sobre las dendritas (Westenbroek y cols., 1998a), controlando la liberación de varios neurotransmisores (Wheeler y cols., 1994). Por otro lado, los canales tipo L (Cav1.3) localizados en la parte proximal de las dendritas y en los cuerpos neuronales (Ahlijanian y cols., 1990; Westenbroek y cols., 1990, 1998b) están asociados con la regulación de la expresión de genes y también de la actividad de enzimas en neuronas corticales y de hipocampo (Murphy y cols., 1991; Bading y cols., 1993).

Como las neuronas, las células cromafines de la médula adrenal expresan CCVD de tipo L (Ceña y cols., 1983, 1989; García y cols., 1984; Bossu y cols., 1991 a, b; Artalejo y cols., 1991), de tipo N (Ballesta y cols., 1989; Artalejo y cols., 1992a; Gandía y cols., 1993a,b), de tipo P/Q (Gandía y cols., 1993a) y de tipo R (García-Palomero y cols., 2000). Pero, a diferencia de las neuronas, estas células no poseen dendritas ni axones. Por ello, los estudios sobre la

especialización de los CCVD en las células cromafines, que son esféricas cuando están en cultivo, han mostrado resultados poco concluyentes (García y cols., 2006). Además, subtipos específicos de CCVD se expresan en distintas densidades en las células cromafines en cultivo y en la médula adrenal intacta (Benavides y cols., 2004), lo que también podría influir en los resultados, ya que no son extrapolables a otros sistemas.

Entonces, ¿por qué esta población tan heterogénea de CCVD en la misma célula? ¿desempeñan estos CCVD funciones específicas para controlar, de forma muy fina, diferentes funciones primordiales en las células cromafines? Existen dos teorías para dar respuesta a estas preguntas: 1) propone que todos los CCVD contribuyen de la misma forma, dependiendo de su densidad relativa, y que es la $[Ca^{2+}]_i$ en la célula la que induce los cambios, independientemente del canal por el que entre el Ca^{2+} ; 2) otra asocia a un subtipo de CCVD con un papel más específico en el control de determinados procesos fisiológicos. Existen multitud de trabajos que se muestran a favor de una y de otra hipótesis. En esta variabilidad intervienen muchos factores que influyen en los resultados obtenidos como el estímulo (García y cols., 2006), el patrón de estimulación (García-de-Diego y cols., 2006), la especie animal (García y cols., 2006) y, especialmente, los métodos utilizados para el estudio sobre todo el uso de bloqueantes farmacológicos para disecar la contribución de cada una de las corrientes mediadas por los CCVD. Por ejemplo, se ha investigado intensamente el proceso de exocitosis en las células cromafines, por ser un modelo neurosecretor aceptado, y se ha sugerido cierta especialización que modula este proceso por parte de los CCVD tipo L, asociados preferentemente a las respuestas de liberación en algunos estudios (Jimenez y cols., 1993; Lopez y cols., 1994). Por el contrario, otros trabajos atribuyen más protagonismo a los CCVD tipo N (O'Farrell y cols., 1997) o a los CCVD tipo P/Q (Lara y cols., 1998). Finalmente, otros concluyen que la exocitosis es proporcional a la entrada de Ca^{2+} y a la densidad de la corriente de Ca^{2+} que lleva cada CCVD, sin existir ninguna especialización (Lukyanetz y cols., 1999).

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un estudio sobre la contribución de cada uno de los CCVD al Ca^{2+} intracelular que media la muerte celular inducida por VTD. La exposición a VTD provoca daños en las células cromafines bovinas en cultivo (Jordán y cols. 2000, 2002), relacionada con una entrada de Ca^{2+} a través de CCVD y con una actividad oscilatoria sostenida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Maroto y cols., 1994). Sin embargo, en el estudio de este mecanismo relacionado con los CCVD también existe mucha controversia, ya que para estudiar la contribución de cada subtipo de canal se han utilizado bloqueantes farmacológicos, considerados hasta entonces selectivos, pero que en la actualidad se conoce que actúan sobre más de un canal de forma simultánea. En este sentido, su especificidad puede depender de la concentración utilizada (Bean y Mintz, 1994), por ejemplo, la ω -conotoxina MVIIC, que a altas concentraciones inhibe tanto canales tipo N como P/Q; (Mintz y cols., 1992; Ming y cols., 1994), también varía dependiendo del tipo celular, y del estado fisiológico de la célula, ya que la acción farmacológica puede variar dependiendo de si la célula está hiperpolarizada o despolarizada (Sala y cols., 1986; Artalejo y cols., 1987). Además, concentraciones micromolares de ω -agatoxina IVA bloquean aproximadamente las corrientes tipo N un 30% en neuronas simpáticas y subtalámicas (Sidach y Mintz, 2000), y solamente un 6% en neuronas de Purkinje (Jun y cols., 1999). Se ha descrito un comportamiento similar de esta toxina en células cromafines, donde el bloqueo desaparece cuando la ω -agatoxina IVA fue aplicada tras nifedipino y ω -conotoxina GVIA (Aldea y cols., 2002).

En nuestros estudios hemos utilizado una nueva herramienta biotecnológica, que utiliza el mecanismo natural de RNAi para reducir los niveles de RNAm de los diferentes subtipos de CCVD disminuyendo así su biodisponibilidad para la expresión de estos tipos de canales. Este mecanismo es muy selectivo, y consigue una eficiencia de silenciamiento entre el 70 y el 80%, que nos permite realizar estudios de “ausencia de función”. Además, se evitan los efectos de compensación que ocurren en los ratones *knock-down* o *knock-out* (Jun y cols., 1999; Platzer y cols., 2000). De este modo, hemos observado una contribución diferencial a la muerte por

sobrecarga de Ca^{2+} , dependiendo del CCVD que permite el paso del ión al interior célula, es decir, nuestros resultados apoyan la hipótesis que propone que la muerte inducida por VTD depende fundamentalmente de la vía de entrada del ión Ca^{2+} al interior celular, aunque requiere que se alcance una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que debe permanecer elevada cierto tiempo para producir toxicidad.

4.1.- Papel de los CCVD tipo L

Los CCVD son entidades moleculares que están en continua transición entre los estados abiertos e inactivos (Hess y cols., 1984). En células cromafines bovinas, los CCVD de tipo L son menos sensibles al voltaje que los tipo N y P/Q (Villarroya y cols., 1999), y a la inactivación dependiente de Ca^{2+} (Hernández-Guijo y cols., 2001). Obviamente, este distinto patrón de inactivación podría provocar diferentes señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (García y cols., 2006). Se ha observado que la entrada de Ca^{2+} a través del CCVD tipo L fue más efectiva a la hora de disparar los procesos de exo- y endocitosis, por lo que estos datos son compatibles con la hipótesis de que no todos los subtipos de canales de Ca^{2+} en células cromafines contribuyen de la misma forma en distintas funciones celulares (Rosa y cols., 2007)

En el modelo propuesto de sobrecarga de Ca^{2+} inducida por VTD, tras inhibir de forma aguda los subtipos Cav1.1, Cav1.2 y Cav1.3 (CCVD tipo L) aparecieron diferentes patrones ante el efecto tóxico de la VTD. Tanto Cav1.2 como Cav1.3 contribuyeron a una disminución significativa de la entrada de Ca^{2+} a las células cromafines, sin embargo, ninguno fue capaz de ejercer un efecto protector cuando estudiamos la sobreproducción de ROS ni sobre la actividad mitocondrial. En cambio, sí que encontramos que previenen parcialmente la activación de la caspasa 3.

En el caso de Cav1.2, la más abundante de estas subunidades en las células cromafines bovinas (Benavides y cols., 2007), además, presentó un cierto efecto protector frente a la muerte celular, como se observa en los resultados del ensayo de LDH. Este comportamiento nos hace pensar que pudiera existir otra vía de muerte inducida por VTD, más desorganizada, en la

que intervendrían Cav1.2 y Cav1.3. Esto sugeriría que, debido a la mayor abundancia de la subunidad Cav1.2, al silenciarla, repercutiría sobre la muerte celular, ejerciendo cierto efecto protector. Sin embargo, el efecto protector obtenido tras reducir los niveles del CCVD tipo Cav1.2 no fue el esperado, ya que en estudios previos se ha observado que es responsable de casi la mitad de las corrientes de Ca^{2+} que entra en las células cromafines (García y cols., 2006). Esto nos hace plantear que quizá su contribución al mecanismo de muerte celular inducido por VTD sea mucho menor que el observado en otros tipos de funciones celulares, como en la endocitosis o en el proceso de exocitosis (López y cols., 1994; Rosa y cols., 2007).

4.2.- Papel de los CCVD tipo N

Durante los últimos años, se han dirigido grandes esfuerzos en investigación para encontrar formas de protección frente a la degeneración neuronal en ciertas condiciones patológicas relacionadas con una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular. En relación con el influjo de elevadas cantidades de Ca^{2+} y su contribución a la muerte neuronal, muchos estudios han demostrado que las formas farmacológicas de limitar este influjo de Ca^{2+} , funcionan atenuando la degeneración neuronal en varias condiciones experimentales (Rothman y Olney, 1986).

Una concentración de ω -conotoxina MVIIA (3 μM), suficiente para bloquear todos los CCVD tipo N, produjo una protección del 43% en rodajas de hipocampo de rata (Small y cols., 1997). El valor de la contribución relativa de los canales tipo N a la muerte neuronal está en concordancia con estudios previos de la contribución de los canales tipo N en la transmisión sináptica en el hipocampo observada por Wu y Saggau de un 40% (Wu y Saggau, 1994), y con Wheeler y cols., de un 46% (Wheeler y cols., 1994). Sin embargo, parece que esta protección no se debe sólo al bloqueo de los CCVD de tipo N, ya que se ha observado que la ω -conotoxina MVIIA también bloquea parcialmente las corrientes de tipo P/Q (Gandía y cols., 1993b; Maroto y cols., 1996). Se conocen varios trabajos sobre neuroprotección *in vivo* utilizando los

bloqueantes ω -conotoxina GIVA o ω -conotoxina MVIIA (Valentino y cols., 1993; Buchan y cols., 1994; Hovda y cols., 1994; Yamada y cols., 1994a, b; Zhao y cols., 1994; Takizawa y cols., 1995). Observando los trabajos en los que los ω -conopéptidos bloquean la liberación de neurotransmisores (Dooley y cols., 1987, 1988; Dutar y cols., 1989), los bloqueantes de los canales tipo N se estudiaron *in vivo* en modelos de isquemia cerebral con éxito relativo (Smith y Siesjö, 1992; Valentino y cols., 1993).

Nuestros resultados tras silenciar de forma específica los CCVD de tipo N (Cav2.2), mostraron que la entrada de Ca^{2+} a las células tras la adición de VTD (100 μM) disminuyó prácticamente a la mitad. Además, mostró un efecto protector significativo en todos los estudios realizados sobre la toxicidad inducida por la VTD en las células cromafines bovinas, tanto en la producción de ROS, como sobre la actividad mitocondrial, la activación de caspasa 3 y sobre la muerte celular medida por ensayo de LDH. En este sentido, nuestros datos muestran que los CCVD tipo N son los que más contribuyen al mecanismo de muerte por sobrecarga de Ca^{2+} inducido por VTD en células cromafines bovinas junto con el tipo P/Q, ya que aunque se observa una ligera contribución mayor del tipo N, estadísticamente, las diferencias entre ellos no fueron significativas.

4.3.- Papel de los CCVD tipo P/Q

Existe muy poca información sobre la eficacia de los bloqueantes de CCVD tipo P/Q. Se ha observado que estos canales contribuyen de forma significativa a la liberación de glutamato en el hipocampo *in vivo* (Valentino y cols., 1993) y en la transmisión sináptica en el hipocampo *in vitro* (Wheeler y cols., 1994; Igelmund y cols., 1996), haciendo de ellos unas atractivas dianas para la intervención terapéutica en los procesos de muerte neuronal por excitotoxicidad.

La toxicidad de los bloqueantes utilizados selectivamente sobre los CCVD tipo P/Q ha dificultado los esfuerzos para la investigación de su potencial efecto neuroprotector (Valentino y cols., 1993), existiendo muy pocos estudios

sobre ellos (Small y cols., 1995; Maroto y cols., 1996). Se ha desarrollado un modelo de ratón *knock out* para el gen $\alpha 1A$, que codifica para el CCVD tipo P/Q. Curiosamente, las consecuencias de esta supresión génica fueron de un incremento de las corrientes tipo L de un 20% (Aldea y cols., 2002). Esto sugiere la existencia de algún tipo de compensación durante el desarrollo cuando se altera la expresión de algún tipo de CCVD, desencadenándose en la célula una sobreexpresión de otros subtipos de CCVD, para ejercer su función y mantener la homeostasis del Ca^{2+} celular. El subtipo de CCVD que la célula sobreexpresa como mecanismo de compensación, parece estar relacionado con el tipo celular y su función principal. En este sentido, se ha descrito que ante la ausencia del tipo P/Q se expresa el tipo L, por estar más próximo a la maquinaria secretora (función principal de las células cromafines), y mantener así la secreción (Lara y cols., 1998). Estos procesos de sobrecompensación durante el desarrollo, hacen que el uso de ratones *knock out*, no sea la mejor aproximación para responder sobre el papel selectivo de ciertos CCVD en la regulación de ciertas funciones celulares.

Estudios previos muestran que los resultados obtenidos con bloqueantes farmacológicos considerados específicos de este canal, dependen en gran medida de la concentración utilizada. Por ejemplo, en un modelo de privación de oxígeno y glucosa en rodajas de glándula adrenal de ratón, 20 nM de ω -agatoxina IVA no mostró efecto neuroprotector, pero a una concentración de 200 nM de ω -agatoxina IVA se obtuvo un importante efecto en el mismo modelo (Small y cols., 1995). En cambio, a concentraciones de 100 nM de ω -conotoxina MVIIC (Maroto y cols., 1996), considerada también específica de estos canales, resultó ser más protectora que el tratamiento con 200 nM de ω -agatoxina IVA (Aldea y cols., 2002).

Tras la reducción de forma aguda de los niveles de los CCVD tipo P/Q, los resultados que obtuvimos muestran una importante contribución a la entrada de Ca^{2+} a la célula tras la estimulación con VTD (100 μ M), que interviene en los procesos que desembocan en la muerte celular, mostrando un efecto protector cuando se midió por ensayo de LDH. Esto nos plantea la hipótesis

de que la aproximación a este problema utilizando bloqueantes farmacológicos no es la mas adecuada ya que, probablemente, estén bloqueando más tipos de CCVD de los deseados.

4.4.- Papel de los CCVD tipo R

Se ha discutido mucho sobre la existencia de los CCVD tipo R, ya que las evidencias de los canales tipo R eran pocas. Algunos trabajos han mostrado que las células cromafines bovinas expresan el RNAm $\alpha 1E$, que posiblemente codifica los canales R en estas células (García-Palomero *y cols.*, 2000), y se observó que su expresión se veía disminuída en las células cromafines bovinas en cultivo respecto a las de la médula adrenal intacta (Benavides *y cols.*, 2004). Estudios *in situ* en las células cromafines de rodajas de la médula adrenal de ratones presentan una fracción de la corriente de Ca^{2+} global correspondiente a ellos. En cambio, en estudios *in vitro* no se ha observado la fracción R en cultivos celulares (Albillos *y cols.*, 1996) debido al uso de la técnica de parche perforado en la configuración entera (*whole-cell*) de la técnica de patch-clamp (Albillos *y cols.*, 2000), ya que parece que algún tipo de componente citosólico se pierde al realizar la técnica.

Nuestros resultados muestran la expresión de estos CCVD mediante el análisis del RNAm $\alpha 1E$ con la técnica de real time RT-PCR. Además, fueron silenciados para el estudio de su implicación en el proceso de muerte celular inducido por VTD (100 μM). Se observó que tras su silenciamiento no existían cambios significativos en la entrada de Ca^{2+} en las células cromafines bovinas, ni en el resto de pruebas realizadas, concluyendo que su participación en este proceso no era significativa. En otros estudios, este tipo de CCVD se ha relacionado con la maquinaria exocitótica de las células para regular rápidamente el proceso de secreción (Albillos *y cols.*, 2000).

4.5.- Papel combinado de los subtipos de CCVD Cav2.1 y Cav2.2

Los datos sugieren que en la muerte celular inducida por VTD (100 μ M), los canales que más contribuyen a la muerte celular son los de tipo Cav2.1 (tipo P/Q) y Cav2.2 (tipo N), pero a la vista de que su efecto protector no era suficiente para prevenir totalmente a la célula del daño sufrido, decidimos silenciar simultáneamente estas subunidades, mostrando que la inhibición conjunta, como cabría esperar, disminuye drásticamente la citotoxicidad inducida por VTD. Así, observamos que los niveles de RNAm de estas subunidades disminuyen drásticamente tras el silenciamiento y que la entrada de Ca^{2+} a la célula desciende prácticamente en un 75%, lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en el ensayo de LDH, donde muestra un importante efecto protector sobre las células cromafines bovinas.

Estos datos apoyan la hipótesis de que existe una asociación entre ciertos CCVD, en este caso, los tipos N y P/Q, y el control de ciertas funciones celulares, en particular, la producción de muerte por sobrecarga de Ca^{2+} . Este hecho podría tener repercusiones a la hora de diseñar fármacos más eficaces y selectivos para tratar enfermedades neurodegenerativas causadas por sobrecarga de Ca^{2+} . Por otra parte, en esta Tesis Doctoral se muestra una nueva herramienta, a través de la terapia génica, utilizando NPs como vectores no virales, capaces de introducir el siRNA específico para silenciar de forma aguda y selectiva los CCVD involucrados en los procesos de degeneración neuronal, en las condiciones patológicas relacionadas con una sobrecarga de Ca^{2+} intracelular.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y a la luz de los resultados obtenidos, podemos exponer las siguientes conclusiones:

- 1.- El empleo del dendrímero TRANSGEDEN[®] para transfectar RNA pequeño de interferencia (siRNA) en células postmitóticas permite alcanzar niveles de inhibición de la proteína diana de hasta un 80%, lo que permite realizar estudios de “ausencia de función”.
- 2.- La exposición a *Veratridina* (100 μ M) activa una secuencia de mecanismos que incluyen: un aumento de la concentración de calcio intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno, y disfunción mitocondrial, que conlleva a la activación de caspasas y a la muerte celular.
- 3.- El vector no-viral, TRANSGEDEN[®], permite transfectar siRNA específico en células cromafines bovinas, y promover un silenciamiento superior al 70% de las subunidades Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav2.1, Cav2.2 y Cav2.3 de los canales de calcio voltaje-dependientes presentes en dichas células.
- 4.- Los canales de calcio voltaje-dependientes Cav2.2 (tipo N), junto con el Cav2.1 (tipo P/Q), son los que contribuyen en mayor proporción al incremento de la concentración de calcio intracelular inducida por *Veratridina*, seguidos por el canal Cav1.2 (tipo L).
- 5.- El silenciamiento de las subunidades Cav2.1 y Cav2.2 de forma simultánea es capaz de proteger a las células cromafines bovinas de la toxicidad inducida por *Veratridina* en más de un 75%.
- 6.- Parece observarse una asociación entre el calcio que entra por los canales de calcio voltaje-dependientes Cav2.1 (tipo P/Q) y Cav2.2 (tipo N), y la muerte neuronal producida por *Veratridina*. Esto sugiere que existe una especialización de los canales de calcio voltaje-dependientes en proporcionar calcio para el inicio y/o la regulación de determinados procesos celulares como la muerte celular.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah B, Hassan A, Benoist C, Goula D, Behr JP y Demeneix BA (1996). A powerful nonviral vector for *in vivo* gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 7:1947-1954.
- Abernethy DR y Schwartz JB (1999). Calcium-antagonist drugs. *N Engl J Med* 341:1447-1457.
- Ackerman MJ y Clapham DE (1997). Ion channels--basic science and clinical disease. *N Engl J Med* 336:1575-1586.
- Adams DJ, Smith AB, Schroeder CI, Yasuda T y Lewis RJ (2003). Omega-conotoxin CVID inhibits a pharmacologically distinct voltage-sensitive calcium channel associated with transmitter release from preganglionic nerve terminals. *J Biol Chem* 278:4057-4062.
- Aguado L y Perez L (1997). The NMDA-receptor antagonist ketamine as an unconditioned stimulus in taste aversion learning. *Neurobiol Learn Mem* 68:189-196.
- Ahlijanian MK, Westenbroek RE y Catterall WA (1990). Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron* 4:819-832.
- Akaike N, Kanaide H, Kuga T, Nakamura M, Sadoshima J y Tomoike H (1989). Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J Physiol* 416:141-160.
- Albillos A, Garcia A y Gandia L (1993). Omega-agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* 336:259-262.
- Albillos A, Gandia L, Michelena P, Gilabert JA, del VM, Carbone y Garcia AG (1996). The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 494 (Pt 3):687-695.
- Albillos A, Carbone E, Gandia L, Garcia AG y Pollo A (1996). Opioid inhibition of Ca²⁺ channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur J Neurosci* 8:1561-1570.
- Albillos A, Neher E y Moser T (2000). R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci* 20:8323-8330.
- Aldea M, Jun K, Shin HS, Andres-Mateos E, Solis-Garrido LM, Montiel C, Garcia AG y Albillos A (2002). A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and alpha(1A) knockout mice. *J Neurochem* 81:911-921.

- Alvarez-Lorenzo C, Barreiro-Iglesias R, Concheiro A, Iourtchenko L, Alakhov V, Bromberg L, Temchenko M, Deshmukh S y Hatton TA (2005). Biophysical characterization of complexation of DNA with block copolymers of poly(2-dimethylaminoethyl) methacrylate, poly(ethylene oxide), and poly(propylene oxide). *Langmuir* 21:5142-5148.
- Amy C y Kirshner N (1982). $^{22}\text{Na}^+$ uptake and catecholamine secretion by primary cultures of adrenal medulla cells. *J Neurochem* 39:132-142.
- Ansari MA, Joshi G, Huang Q, Opii WO, Abdul HM, Sultana R y Butterfield DA (2006). In vivo administration of D609 leads to protection of subsequently isolated gerbil brain mitochondria subjected to in vitro oxidative stress induced by amyloid beta-peptide and other oxidative stressors: relevance to Alzheimer's disease and other oxidative stress-related neurodegenerative disorders. *Free Radic Biol Med* 41:1694-1703.
- Artalejo CR, Garcia AG y Aunis D (1987). Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium, and barium fluxes. *J Biol Chem* 262:915-926.
- Artalejo CR, Dahmer MK, Perlman RL y Fox AP (1991). Two types of Ca^{2+} currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. *J Physiol* 432:681-707.
- Artalejo CR, Rossie S, Perlman RL y Fox AP (1992a). Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca^{2+} current facilitation in chromaffin cells. *Nature* 358:63-66.
- Artalejo CR, Perlman RL y Fox AP (1992b). Omega-conotoxin GVIA blocks a Ca^{2+} current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. *Neuron* 8:85-95.
- Artalejo CR, Garcia AG y Neher E (1993). Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* 423:97-103.
- Artalejo CR, Henley JR, McNiven MA y Palfrey HC (1995). Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca^{2+} , GTP, and dynamin but not clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8328-8332.
- Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K y Rorsman P (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* 55 Suppl:54-65.
- Ashley RH (1986). External calcium, intrasynaptosomal free calcium and neurotransmitter release. *Biochim Biophys Acta* 854:207-212.
- Atchison WD (2003). Effects of toxic environmental contaminants on voltage-gated calcium channel function: from past to present. *J Bioenerg Biomembr* 35:507-532.

- Auer RN y Siesjo BK (1993). *Hypoglycaemia: brain neurochemistry and neuropathology*. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 7:611-625.
- Bading H, Ginty DD y Greenberg ME (1993). *Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways*. *Science* 260:181-186.
- Bailey SJ, Wood NI, Samson NA, Rothaul AL, Roberts JC, King PD, Hamilton TC, Harrison DC y Hunter AJ (1995). *Failure of isradipine to reduce infarct size in mouse, gerbil, and rat models of cerebral ischemia*. *Stroke* 26:2177-2183.
- Ballesta JJ, Palmero M, Hidalgo MJ, Gutierrez LM, Reig JA, Viniestra S y Garcia AG (1989). *Separate binding and functional sites for omega-conotoxin and nitrendipine suggest two types of calcium channels in bovine chromaffin cells*. *J Neurochem* 53:1050-1056.
- Barone FC, Lysko PG, Price WJ, Feuerstein G, al-Baracani KA, Benham CD, Harrison DC, Harries MH, Bailey SJ y Hunter AJ (1995). *SB 201823-A antagonizes calcium currents in central neurons and reduces the effects of focal ischemia in rats and mice*. *Stroke* 26:1683-1689.
- Beam KG, Tanabe T y Numa S (1989). *Structure, function, and regulation of the skeletal muscle dihydropyridine receptor*. *Ann N Y Acad Sci* 560:127-137.
- Bean BP (1985). *Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology*. *J Gen Physiol* 86:1-30.
- Benavides A, Calvo S, Tornero D, Gonzalez-Garcia C y Ceña V (2004). *Adrenal medulla calcium channel population is not conserved in bovine chromaffin cells in culture*. *Neuroscience* 128:99-109.
- Benham CD, Brown TH, Cooper DG, Evans ML, Harries MH, Herdon HJ, Meakin JE, Murkitt KL, Patel SR y Roberts JC (1993). *SB 201823-A, a neuronal Ca²⁺ antagonist is neuroprotective in two models of cerebral ischaemia*. *Neuropharmacology* 32:1249-1257.
- Bernardi P (1999). *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition*. *Physiol Rev* 79:1127-1155.
- Bernatchez G, Sauve R y Parent L (2001). *State-dependent inhibition of inactivation-deficient Ca(V)1.2 and Ca(V)2.3 channels by mibefradil*. *J Membr Biol* 184:143-159.
- Bezprozvanny I y Tsien RW (1995). *Voltage-dependent blockade of diverse types of voltage-gated Ca²⁺ channels expressed in Xenopus oocytes by the Ca²⁺ channel antagonist mibefradil (Ro 40-5967)*. *Mol Pharmacol* 48:540-549.

- Bianco A, Kostarelou K y Prato M (2008). Opportunities and challenges of carbon-based nanomaterials for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 5:331-342.
- Boas U y Heegaard PM (2004). Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev* 33:43-63.
- Boatright KM y Salvesen GS (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15:725-731.
- Bolcato-Bellemin AL, Bonnet ME, Creusat G, Erbacher P y Behr JP (2007). Sticky overhangs enhance siRNA-mediated gene silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16050-16055.
- Bossu JL, De WM y Feltz A (1991a). Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol* 437:621-634.
- Bossu JL, De WM y Feltz A (1991b). Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. *J Physiol* 437:603-620.
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y y Miyazaki S (1976). Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J Physiol* 263:417-439.
- Brunner S, Furtbauer E, Sauer T, Kursa M y Wagner E (2002). Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation. *Mol Ther* 5:80-86.
- Buchan AM, Gertler SZ, Li H, Xue D, Huang ZG, Chaundy KE, Barnes K y Lesiuk HJ (1994). A selective N-type Ca(2+)-channel blocker prevents CA1 injury 24 h following severe forebrain ischemia and reduces infarction following focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:903-910.
- Cai D, Mulle JG y Yue DT (1997). Inhibition of recombinant Ca²⁺ channels by benzothiazepines and phenylalkylamines: class-specific pharmacology and underlying molecular determinants. *Mol Pharmacol* 51:872-881.
- Calvo S, Granja R, Gonzalez-Garcia C y Ceña V (1995). Catecholamine secretion, calcium levels and calcium influx in response to membrane depolarization in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 68:265-272.
- Cano-Abad MF, Lopez MG, Hernandez-Guijo JM, Zapater P, Gandia L, Sanchez-Garcia P y Garcia AG (1998). Effects of the neuroprotectant lubeluzole on the cytotoxic actions of veratridine, barium, ouabain and 6-hydroxydopamine in chromaffin cells. *Br J Pharmacol* 124:1187-1196.

- Cano-Abad MF, Villarroya M, Garcia AG, Gabilan N y, Lopez MG (2001). Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem* 276:39695-39704.
- Carrion B, Perez-Martinez FC, Monteagudo S, Perez-Carrion MD, Gomez-Roldan C, Ceña V y Perez-Martinez J (2011). Atorvastatin reduces high glucose toxicity in rat peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 31:325-331.
- Catterall WA y Coppersmith J (1981). High-affinity saxitoxin receptor sites in vertebrate heart. Evidence for sites associated with autonomic nerve endings. *Mol Pharmacol* 20:526-532.
- Catterall WA (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP y Striessnig J (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 57:411-425.
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ y Hammond SM (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 16:2491-2496.
- Ceña V, Nicolas GP, Sanchez-Garcia P, Kirpekar SM y Garcia AG (1983). Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* 10:1455-1462.
- Ceña V, Stutzin, A and Rojas E (1989). Effects of calcium and BAY K-8644 on calcium currents in adrenomedullary chromaffin cells. *J. Membr. Biol.* 112, 255-265.
- Cheek TR y Barry VA (1993a). Stimulus-secretion coupling in excitable cells: a central role for calcium. *J Exp Biol* 184:183-196.
- Cheek TR, Morgan A, O'Sullivan AJ, Moreton RB, Berridge MJ y Burgoyne RD (1993b). Spatial localization of agonist-induced Ca^{2+} entry in bovine adrenal chromaffin cells. Different patterns induced by histamine and angiotensin II, and relationship to catecholamine release. *J Cell Sci* 105 (Pt 4):913-921.
- Chen RJ, Chang DY, Yen ML, Lee EF, Huang SC, Chow SN y Hsieh CY (1998). Prognostic factors of primary adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 69:157-164.
- Chen RJ, Bangsaruntip S, Drouvalakis KA, Kam NW, Shim M, Li Y, Kim W, Utz PJ y Dai H (2003). Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4984-4989.

- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K y Zhang CY (2012). Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* 3:28-37.
- Chirmule N, Xiao W, Truneh A, Schnell MA, Hughes JV, Zoltick P y Wilson JM (2000). Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol* 74:2420-2425.
- Choi DW y Viseskul V (1988). Opioids and non-opioid enantiomers selectively attenuate N-methyl-D-aspartate neurotoxicity on cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 155:27-35.
- Chouabe C, Drici MD, Romey G y Barhanin J (2000). Effects of calcium channel blockers on cloned cardiac K⁺ channels IKr and IKs. *Therapie* 55:195-202.
- Chuang RS, Jaffe H, Cribbs L, Perez-Reyes E y Swartz KJ (1998). Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin. *Nat Neurosci* 1:668-674.
- Cooper EC y Jan LY (1999). Ion channel genes and human neurological disease: recent progress, prospects, and challenges. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4759-4766.
- Coupland RE (1965a). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. *J Anat* 99:231-254.
- Coupland RE (1965b). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *J Anat* 99:255-272.
- Craviso GL, Chatterjee I y Publicover NG (2003). Catecholamine release from cultured bovine adrenal medullary chromaffin cells in the presence of 60-Hz magnetic fields. *Bioelectrochemistry* 59:57-64.
- Crowe S (2003). Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication, by Martinez et al. *AIDS* 17 Suppl 4:S103-S105.
- Csaba N, Koping-Hoggard M, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Riguera R y Alonso MJ (2009). Ionically crosslinked chitosan nanoparticles as gene delivery systems: effect of PEGylation degree on in vitro and in vivo gene transfer. *J Biomed Nanotechnol* 5:162-171.
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ y Ciccarone VC (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33:95-103.

- de Diego AM, Gandia L y Garcia AG (2008). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)* 192:287-301.
- Diochot S, Richard S, Baldy-Moulinier M, Nargeot J y Valmier J (1995). Dihydropyridines, phenylalkylamines and benzothiazepines block N-, P/Q- and R-type calcium currents. *Pflugers Arch* 431:10-19.
- Doering CJ y Zamponi GW (2003). Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.
- Doering CJ y Zamponi GW (2005). Molecular pharmacology of non-L-type calcium channels. *Curr Pharm Des* 11:1887-1898.
- Dooley DJ, Lupp A y Hertting G (1987). Inhibition of central neurotransmitter release by omega-conotoxin GVIA, a peptide modulator of the N-type voltage-sensitive calcium channel. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:467-470.
- Dooley DJ, Lupp A, Hertting G y Osswald H (1988). Omega-conotoxin GVIA and pharmacological modulation of hippocampal noradrenaline release. *Eur J Pharmacol* 148:261-267.
- Duchaine TF, Wohlschlegel JA, Kennedy S, Bei Y, Conte D, Jr., Pang K, Brownell DR, Harding S, Mitani S, Ruvkun G, Yates JR, III y Mello CC (2006). Functional proteomics reveals the biochemical niche of *C. elegans* DCR-1 in multiple small-RNA-mediated pathways. *Cell* 124:343-354.
- Dunlap DD, Maggi A, Soria MR y Monaco L (1997). Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res* 25:3095-3101.
- Dunlap K, Luebke JI y Turner TJ (1995). Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci* 18:89-98.
- Dutar P, Rascol O y Lamour Y (1989). Omega-conotoxin GVIA blocks synaptic transmission in the CA1 field of the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 174:261-266.
- Dykxhoorn DM y Lieberman J (2006). Knocking down disease with siRNAs. *Cell* 126:231-235.
- Dykxhoorn DM, Palliser y Lieberman J (2006). The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther* 13:541-552.
- El-Sayed A, Khalil IA, Kogure K, Futaki S y Harashima H (2008). Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem* 283:23450-23461.

- Eranko O (1955). *Histochemistry of noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice. Endocrinology 57:363-368.*
- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW y Catterall WA (2000). *Nomenclature of voltage-gated calcium channels. Neuron 25:533-535.*
- Ertel SI y Ertel EA (1997). *Low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. Trends Pharmacol Sci 18:37-42.*
- Eulalio A, Huntzinger E e Izaurralde E (2008). *Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. Cell 132:9-14.*
- Fabiato A (1983). *Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. Am J Physiol 245:C1-14.*
- Faulkner KM, Liochev SI y Fridovich I (1994). *Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. J Biol Chem 269:23471-23476.*
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM y Danielsen M (1987). *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci U S A 84:7413-7417.*
- Fenwick EM, Fajdiga PB, Howe NB y Livett BG (1978). *Functional and morphological characterization of isolated bovine adrenal medullary cells. J Cell Biol 76:12-30.*
- Fenwick EM, Marty A y Neher E (1982a). *Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. J Physiol 331:599-635.*
- Fenwick EM, Marty A y Neher E (1982b). *A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. J Physiol 331:577-597.*
- Fernandez de SD, Fuenzalida M, Porto Pazos AB y Buno W (2007). *Selective shunting of the NMDA EPSP component by the slow afterhyperpolarization in rat CA1 pyramidal neurons. J Neurophysiol 97:3242-3255.*
- Finkbeiner S y Greenberg ME (1998). *Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression. J Neurobiol 37:171-189.*
- Finnegan JM y Wightman RM (1995). *Correlation of real time catecholamine release and cytosolic Ca²⁺ at single bovine chromaffin cells. J Biol Chem 270:5353-5359.*
- Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP y Kissel T (1999). *A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of*

- molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 16:1273-1279.
- Fraley R y Papahadjopoulos D (1982). Liposomes: the development of a new carrier system for introducing nucleic acid into plant and animal cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 96:171-191.
- Friel DD y Tsien RW (1992). A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} store in bullfrog sympathetic neurones modulates effects of Ca^{2+} entry on $[Ca^{2+}]_i$. *J Physiol* 450:217-246.
- Fujita T (1977). Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn* 40 Suppl:1-12.
- Gabrielson NP y Pack DW (2006). Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions. *Biomacromolecules* 7:2427-2435.
- Galindo MF, Jordan J, Gonzalez-Garcia C y Ceña V (2003). Chromaffin cell death induced by 6-hydroxydopamine is independent of mitochondrial swelling and caspase activation. *J Neurochem* 84:1066-1073.
- Gandía L, García AG y Morad M (1993a). ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol* 470:55-72.
- Gandía L, Albillos A y García AG (1993b). Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* 194:671-676.
- Gansbacher B (2003). Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT). *J Gene Med* 5:261-262.
- Garaschuk O, Yaari Y y Konnerth A (1997). Release and sequestration of calcium by ryanodine-sensitive stores in rat hippocampal neurones. *J Physiol* 502 (Pt 1):13-30.
- Garcez-Do-Carmo L, Albillos A, Artalejo AR, de la Fuente MT, Lopez MG, Gandía L, Michelena P y García AG (1993). R56865 inhibits catecholamine release from bovine chromaffin cells by blocking calcium channels. *Br J Pharmacol* 110:1149-1155.
- García-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiacomo KM, Kaczorowski GJ y García ML (1994). Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 269:676-682.
- García-Palomero E, Cuchillo-Ibanez I, García AG, Renart J, Albillos A y Montiel C (2000). Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca^{2+} channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett* 481:235-239.

- Garcia-Palomero E, Renart J, Andres-Mateos E, Solis-Garrido LM, Matute C, Herrero CJ, Garcia AG y Montiel C (2001). Differential expression of calcium channel subtypes in the bovine adrenal medulla. *Neuroendocrinology* 74:251-261.
- Garcia de Diego AM, Arnaiz JJ, Gandia L, Hernandez-Guijo JM y Garcia AG (2006). A comparison between acetylcholine-like action potentials and square depolarizing pulses in triggering calcium entry and exocytosis in bovine chromaffin cells. *J Mol Neurosci* 30:57-58.
- Garcia AG, Sala F, Reig JA, Viniestra S, Frias J, Fonteriz R y Gandia L (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* 309:69-71.
- Garcia AG, Artalejo CR, Borges R, Reig JA y Sala F (1986). Pharmacological properties of the chromaffin cell calcium channel. *Adv Exp Med Biol* 211:139-157.
- Garcia AG, Albillos A, Cano-Abad MF, Garcia-Palomero E, Hernandez-Guijo M, Herrero CJ, Lomax RB y Gandia L (1998). Calcium channels for exocytosis in chromaffin cells. *Adv Pharmacol* 42:91-94.
- Garcia AG, Garcia-De-Diego AM, Gandia L, Borges R y Garcia-Sancho J (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86:1093-1131.
- Goldman DE (1943). Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 27:37-60.
- Gonzalez-Garcia C, Ceña V, Keiser HR y Rojas E (1993). Catecholamine secretion induced by tetraethylammonium from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta* 1177:99-105.
- Gorman AL y Thomas MV (1978). Changes in the intracellular concentration of free calcium ions in a pace-maker neurone, measured with the metallochromic indicator dye arsenazo III. *J Physiol* 275:357-376.
- Gotti B, Benavides J, MacKenzie ET y Scatton B (1990). The pharmacotherapy of focal cortical ischaemia in the mouse. *Brain Res* 522:290-307.
- Gras R, Almonacid L, Ortega P, Serramia MJ, Gomez R, de la Mata FJ, Lopez-Fernandez LA y Munoz-Fernandez MA (2009). Changes in gene expression pattern of human primary macrophages induced by carbosilane dendrimer 2G-NN16. *Pharm Res* 26:577-586.
- Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N y Shiekhattar R (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123:631-640.

- Grosse S, Thevenot G, Monsigny M y Fajac I (2006). Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives? *J Gene Med* 8:845-851.
- Grosshans H y Filipowicz W (2008a). Proteomics joins the search for microRNA targets. *Cell* 134:560-562.
- Grosshans H y Filipowicz W (2008b). Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature* 451:414-416.
- Grynkiewicz G, Poenie M y Tsien RY (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.
- Guerra-Crespo M, Charli JL, Rosales-García VH, Pedraza-Alva G y Perez-Martinez L (2003). Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neurosci Methods* 127:179-192.
- Gunter KK y Gunter TE (1994). Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 26:471-485.
- Guyton AC (1988). *Tratado de Fisiología médica*. McGraw-Hill, Interamericana. Madrid.
- Haberland A, Zaitsev S, Waldofner N, Erdmann B, Bottger M y Henke W (2009). Structural appearance of linker histone H1/siRNA complexes. *Mol Biol Rep* 36:1083-1093.
- Hacein-Bey-Abina S, Von KC, Schmidt M, Le DF, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M y Fischer A (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348:255-256.
- Hammond SM, Caudy AA y Hannon GJ (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* 2:110-119.
- Han L, Suda M, Tsuzuki K, Wang R, Ohe Y, Hirai H, Watanabe T, Takeuchi T y Hosaka M (2008). A large form of secretogranin III functions as a sorting receptor for chromogranin A aggregates in PC12 cells. *Mol Endocrinol* 22:1935-1949.
- Hanlon MR y Wallace BA (2002). Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* 41:2886-2894.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T y Weber K (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114:4557-4565.

- Hartig JV, Tomari Y y Forstemann K (2007). *piRNAs-the ancient hunters of genome invaders. Genes Dev* 21:1707-1713.
- Hering S, Bolton TB, Beech DJ y Lim SP (1989). *Mechanism of calcium channel block by D600 in single smooth muscle cells from rabbit ear artery. Circ Res* 64:928-936.
- Hering S, Savchenko A, Strubing C, Lakitsch M y Striessnig J (1993). *Extracellular localization of the benzothiazepine binding domain of L-type Ca²⁺ channels. Mol Pharmacol* 43:820-826.
- Hernandez-Guijo JM, Maneu-Flores VE, Ruiz-Nuno A, Villarroya M, Garcia AG y Gandia L (2001). *Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. J Neurosci* 21:2553-2560.
- Herrero MA, Toma FM, Al-Jamal KT, Kostarellos K, Bianco A, Da RT, Bano F, Casalis L, Scoles G y Prato M (2009). *Synthesis and characterization of a carbon nanotube-dendron series for efficient siRNA delivery. J Am Chem Soc* 131:9843-9848.
- Hess P, Lansman JB y Tsien RW (1984). *Different modes of Ca²⁺ channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. Nature* 311:538-544.
- Hillarp NA y Hokfelt B (1953). *Evidence of adrenaline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells. Acta Physiol Scand* 30:55-68.
- Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF y Gordinis C (1998). *Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. Development* 125:599-608.
- Hovda DA, Fu K, Badie H, Samii A, Pinanong P y Becker DP (1994). *Administration of an omega-conopeptide one hour following traumatic brain injury reduces 45calcium accumulation. Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60:521-523.
- Hu L, Wang Z, Hu C, Liu X, Yao L, Li W y Qi Y (2005). *Inhibition of Measles virus multiplication in cell culture by RNA interference. Acta Virol* 49:227-234.
- Huang R, Ke W, Liu Y, Jiang C y Pei Y (2008). *The use of lactoferrin as a ligand for targeting the polyamidoamine-based gene delivery system to the brain. Biomaterials* 29:238-246.
- Hubner CA y Jentsch TJ (2002). *Ion channel diseases. Hum Mol Genet* 11:2435-2445.
- Igelmund P, Zhao YQ y Heinemann U (1996). *Effects of T-type, L-type, N-type, P-type, and Q-type calcium channel blockers on stimulus-induced pre- and postsynaptic calcium fluxes in rat hippocampal slices. Exp Brain Res* 109:22-32.

- Islam MA, Shin JY, Firdous J, Park TE, Choi YJ, Cho MH, Yun CH y Cho CS (2012). The role of osmotic polysorbitol-based transporter in RNAi silencing via caveolae-mediated endocytosis and COX-2 expression. *Biomaterials* 33:8868-8880.
- Itano Y, Kitamura Y y Nomura Y (1995). Biphasic effects of MPP+, a possible parkinsonism inducer, on dopamine content and tyrosine hydroxylase mRNA expression in PC12 cells. *Neurochem Int* 26:165-171.
- Izquierdo M (2005). Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 12:217-227.
- Izumrudov VA, Zhiryakova MV y Kudaibergenov SE (1999). Controllable stability of DNA-containing polyelectrolyte complexes in water-salt solutions. *Biopolymers* 52:94-108.
- Jacewicz M, Brint S, Tanabe J y Pulsinelli WA (1990). Continuous nimodipine treatment attenuates cortical infarction in rats subjected to 24 hours of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:89-96.
- Janicke RU, Porter AG y Kush A (1998). A novel *Arabidopsis thaliana* protein protects tumor cells from tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1402:70-78.
- Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D y D'Emanuele A (2004). Transport of dendrimer nanocarriers through epithelial cells via the transcellular route. *J Control Release* 97:259-267.
- Jia F, Zhang YZ y Liu CM (2006). A retrovirus-based system to stably silence hepatitis B virus genes by RNA interference. *Biotechnol Lett* 28:1679-1685.
- Jimenez RR, Lopez MG, Sancho C, Maroto R y Garcia AG (1993). A component of the catecholamine secretory response in the bovine adrenal gland is resistant to dihydropyridines and omega-conotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 191:1278-1283.
- Jones OT (2002). Ca²⁺ channels and epilepsy. *Eur J Pharmacol* 447:211-225.
- Jordan J, Galindo MF, Calvo S, Gonzalez-Garcia C y Ceña V (2000). Veratridine induces apoptotic death in bovine chromaffin cells through superoxide production. *Br J Pharmacol* 130:1496-1504.
- Jordan J, Galindo MF, Tornero D, Benavides A, Gonzalez C, Agapito MT, Gonzalez-Garcia C y Ceña V (2002). Superoxide anions mediate veratridine-induced cytochrome c release and caspase activity in bovine chromaffin cells. *Br J Pharmacol* 137:993-1000.

- Jordan J, Galindo MF, Tornero D, Gonzalez-Garcia C y Ceña V (2004). *Bcl-x L blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells. J Neurochem 89:124-133.*
- Jun K, Piedras-Renteria ES, Smith SM, Wheeler DB, Lee SB, Lee TG, Chin H, Adams ME, Scheller RH, Tsien RW y Shin HS (1999). *Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. Proc Natl Acad Sci U S A 96:15245-15250.*
- Kannan S, Kolhe P, Raykova V, Glibatec M, Kannan RM, Lieh-Lai M y Bassett D (2004). *Dynamics of cellular entry and drug delivery by dendritic polymers into human lung epithelial carcinoma cells. J Biomater Sci Polym Ed 15:311-330.*
- Kempf E y Mandel P (1981). *Reverse-phase high-performance liquid chromatographic separation and electrochemical detection of norepinephrine, dopamine, serotonin, and related major metabolites. Anal Biochem 112:223-231.*
- Kidokoro Y y Ritchie AK (1980). *Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. J Physiol 307:199-216.*
- Kilpatrick DL, Ledbetter FH, Carson KA, Kirshner AG, Slepatis R y Kirshner N (1980). *Stability of bovine adrenal medulla cells in culture. J Neurochem 35:679-692.*
- Kilpatrick DL, Slepatis RJ, Corcoran JJ y Kirshner N (1982). *Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. J Neurochem 38:427-435.*
- Kim ID, Lim CM, Kim JB, Nam HY, Nam K, Kim SW, Park JS y Lee JK (2010). *Neuroprotection by biodegradable PAMAM ester (e-PAM-R)-mediated HMGB1 siRNA delivery in primary cortical cultures and in the postischemic brain. J Control Release 142:422-430.*
- Kim JB, Choi JS, Nam K, Lee M, Park JS y Lee JK (2006). *Enhanced transfection of primary cortical cultures using arginine-grafted PAMAM dendrimer, PAMAM-Arg. J Control Release 114:110-117.*
- Kim SH, Jeong JH, Ou M, Yockman JW, Kim SW y Bull DA (2008). *Cardiomyocyte-targeted siRNA delivery by prostaglandin E(2)-Fas siRNA polyplexes formulated with reducible poly(amido amine) for preventing cardiomyocyte apoptosis. Biomaterials 29:4439-4446.*
- Kim VN (2005). *Small RNAs: classification, biogenesis, and function. Mol Cells 19:1-15.*

- King VF, Garcia ML, Himmel D, Reuben JP, Lam YK, Pan JX, Han GQ y Kaczorowski GJ (1988). Interaction of tetrandrine with slowly inactivating calcium channels. Characterization of calcium channel modulation by an alkaloid of Chinese medicinal herb origin. *J Biol Chem* 263:2238-2244.
- Kobayashi S (1977). Adrenal medulla: chromaffin cells as paraneurons. *Arch Histol Jpn* 40 Suppl:61-79.
- Kochegarov AA (2003). Pharmacological modulators of voltage-gated calcium channels and their therapeutical application. *Cell Calcium* 33:145-162.
- Koh JY y Cotman CW (1992). Programmed cell death: its possible contribution to neurotoxicity mediated by calcium channel antagonists. *Brain Res* 587:233-240.
- Koike T, Martin DP y Johnson EM, Jr. (1989). Role of Ca^{2+} channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca^{2+} determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6421-6425.
- Koike T y Tanaka S (1991). Evidence that nerve growth factor dependence of sympathetic neurons for survival in vitro may be determined by levels of cytoplasmic free Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3892-3896.
- Kroemer G, Zamzami N y Susin SA (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18:44-51.
- Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA y Baker JR, Jr. (1996). Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4897-4902.
- Kumer SC y Vrana KE (1996). Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 67:443-462.
- Kusov Y, Kanda T, Palmenberg A, Sgro JY y Gauss-Muller V (2006). Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. *J Virol* 80:5599-5610.
- Lacerda L, Herrero MA, Venner K, Bianco A, Prato M y Kostarelos K (2008). Carbon-nanotube shape and individualization critical for renal excretion. *Small* 4:1130-1132.
- Lacinova L (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1:1-78.
- Lacinova L y Hofmann F (2005). Ca^{2+} and voltage-dependent inactivation of the expressed L-type $Ca(v)1.2$ calcium channel. *Arch Biochem Biophys* 437:42-50.

- Lambert RC, Maulet Y, Dupont JL, Mykita S, Craig P, Volsen S y Feltz A (1996). Polyethylenimine-mediated DNA transfection of peripheral and central neurons in primary culture: probing Ca^{2+} channel structure and function with antisense oligonucleotides. *Mol Cell Neurosci* 7:239-246.
- Lampe RA, Defeo PA, Davison MD, Young J, Herman JL, Spreen RC, Horn MB, Mangano TJ y Keith RA (1993a). Isolation and pharmacological characterization of omega-gammatoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses. *Mol Pharmacol* 44:451-460.
- Lampe RA, Lo MM, Keith RA, Horn MB, McLane MW, Herman JL y Spreen RC (1993b). Effects of site-specific acetylation on omega-conotoxin GVIA binding and function. *Biochemistry* 32:3255-3260.
- Lara B, Zapater P, Montiel C, de la Fuente MT, Martinez-Sierra R, Ballesta JJ, Gandia L y Garcia AG (1995). Density of apamin-sensitive $Ca(2+)$ -dependent K^+ channels in bovine chromaffin cells: relevance to secretion. *Biochem Pharmacol* 49:1459-1468.
- Lara B, Gandia L, Martinez-Sierra R, Torres A y Garcia AG (1998). Q-type Ca^{2+} channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflugers Arch* 435:472-478.
- Lee HB, Yu MR, Song JS y Ha H (2004). Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 65:1170-1179.
- Lee KS y Tsien RW (1983). Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302:790-794.
- Lehmann-Horn F y Jurkat-Rott K (1999). Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiol Rev* 79:1317-1372.
- Lemoine NR (2002). The power to deliver: stem cells in gene therapy. *Gene Ther* 9:603-605.
- Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S y Martinez J (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7:314-320.
- Li YC, Kong LH, Cheng BZ y Li KS (2005). Construction of influenza virus siRNA expression vectors and their inhibitory effects on multiplication of influenza virus. *Avian Dis* 49:562-573.
- Lin MT y Beal MF (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.

- Liu H, Miller E, van de Water B y Stevens JL (1998). Endoplasmic reticulum stress proteins block oxidant-induced Ca^{2+} increases and cell death. *J Biol Chem* 273:12858-12862.
- Liu XX, Rocchi P, Qu FQ, Zheng SQ, Liang ZC, Gleave M, Iovanna J y Peng L (2009). PAMAM dendrimers mediate siRNA delivery to target Hsp27 and produce potent antiproliferative effects on prostate cancer cells. *ChemMedChem* 4:1302-1310.
- Livett BG y Boksa P (1984). Receptors and receptor modulation in cultured chromaffin cells. *Can J Physiol Pharmacol* 62:467-476.
- Livett BG (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* 64:1103-1161.
- Livett BG, Gayler KR y Khalil Z (2004). Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics. *Curr Med Chem* 11:1715-1723.
- Lopez MG, Villarroya M, Lara B, Martinez SR, Albillos A, Garcia AG y Gandia L (1994). Q- and L-type Ca^{2+} channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett* 349:331-337.
- Lopez MG, Artalejo AR, Garcia AG, Neher E y Garcia-Sancho J (1995). Veratridine-induced oscillations of cytosolic calcium and membrane potential in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 482 (Pt 1):15-27.
- Lukyanetz EA y Neher E (1999). Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 11:2865-2873.
- Ma K, Hu M, Qi Y, Qiu L, Jin Y, Yu J y Li B (2009). Structure-transfection activity relationships with glucocorticoid-polyethyl-enimine conjugate nuclear gene delivery systems. *Biomaterials* 30:3780-3789.
- Mahapatra NR, Taupenot L, Courel M, Mahata SK y O'Connor DT (2008). The trans-Golgi proteins SCLIP and SCG10 interact with chromogranin A to regulate neuroendocrine secretion. *Biochemistry* 47:7167-7178.
- Manunta M, Tan PH, Sagoo P, Kashefi K y George AJ (2004). Gene delivery by dendrimers operates via a cholesterol dependent pathway. *Nucleic Acids Res* 32:2730-2739.
- Mao S, Neu M, Germershaus O, Merkel O, Sitterberg J, Bakowsky U y Kissel T (2006). Influence of polyethylene glycol chain length on the physicochemical and biological properties of poly(ethylene imine)-graft-poly(ethylene glycol) block copolymer/SiRNA polyplexes. *Bioconjug Chem* 17:1209-1218.

- Maroto R, de la Fuente MT, Artalejo AR, Abad F, Lopez MG, Garcia-Sancho J y Garcia AG (1994). Effects of Ca^{2+} channel antagonists on chromaffin cell death and cytosolic Ca^{2+} oscillations induced by veratridine. *Eur J Pharmacol* 270:331-339.
- Maroto R, de la Fuente MT, Zapater P, Abad F, Esquerro E y Garcia AG (1996). Effects of omega-conotoxin MVIIC on veratridine-induced cytotoxicity and cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Brain Res* 714:209-214.
- Marty A (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature* 291:497-500.
- Mathie A, Bernheim L y Hille B (1992). Inhibition of N- and L-type calcium channels by muscarinic receptor activation in rat sympathetic neurons. *Neuron* 8:907-914.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP y Zamore PD (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123:607-620.
- Mattson MP, Barger SW, Begley JG y Mark RJ (1995). Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol* 46:187-216.
- McDonald TF, Pelzer D y Trautwein W (1984). Cat ventricular muscle treated with D600: characteristics of calcium channel block and unblock. *J Physiol* 352:217-241.
- McDonough SI (2007). Gating modifier toxins of voltage-gated calcium channels. *Toxicon* 49:202-212.
- McGivern JG (2006). Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov Today* 11:245-253.
- McNulty TJ y Taylor CW (1993). Caffeine-stimulated Ca^{2+} release from the intracellular stores of hepatocytes is not mediated by ryanodine receptors. *Biochem J* 291 (Pt 3):799-801.
- Meisler MH, Kearney J, Escayg A, MacDonald BT y Sprunger LK (2001). Sodium channels and neurological disease: insights from *Scn8a* mutations in the mouse. *Neuroscientist* 7:136-145.
- Mellott AJ, Forrest ML y Detamore MS (2012). Physical Non-Viral Gene Delivery Methods for Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng.*
- Merkel OM, Librizzi D, Pfestroff A, Schurrat T, Buyens K, Sanders NN, De Smedt SC, Behe M y Kissel T (2009). Stability of siRNA polyplexes from poly(ethylenimine) and poly(ethylenimine)-g-poly(ethylene glycol) under in vivo conditions: effects on

- pharmacokinetics and biodistribution measured by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy and Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) imaging. *J Control Release* 138:148-159.
- Ming Y, Zhang H, Long L, Wang F, Chen J y Zhen X (2006). Modulation of Ca^{2+} signals by phosphatidylinositol-linked novel D1 dopamine receptor in hippocampal neurons. *J Neurochem* 98:1316-1323.
- Minta A, Kao JP y Tsien RY (1989). Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264:8171-8178.
- Mintz IM, Venema VJ, Adams ME y Bean BP (1991). Inhibition of N- and L-type Ca^{2+} channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6628-6631.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP y Adams ME (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 355:827-829.
- Mintz IM (1994). Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIa. *J Neurosci* 14:2844-2853.
- Missiaen L, Robberecht W, Van den Bosch L, Callewaert G, Parys JB, Wuytack F, Raeymaekers L, Nilius B, Eggermont J y De SH (2000). Abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis and disease. *Cell Calcium* 28:1-21.
- Monteagudo S, Perez-Martinez FC, Perez-Carrion MD, Guerra J, Merino S, Sanchez-Verdu MP y Ceña V (2012). Inhibition of p42 MAPK using a nonviral vector-delivered siRNA potentiates the anti-tumor effect of metformin in prostate cancer cells. *Nanomedicine (Lond)* 7:493-506.
- Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM y Roberts-Thomson SJ (2007). Calcium and cancer: targeting Ca^{2+} transport. *Nat Rev Cancer* 7:519-530.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J y Alvarez J (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2:57-61.
- Montiel C, Lopez MG, Sanchez-Garcia P, Maroto R, Zapater P y Garcia AG (1995). Contribution of SK and BK channels in the control of catecholamine release by electrical stimulation of the cat adrenal gland. *J Physiol* 486 (Pt 2):427-437.
- Moreno MS, Weyland M, Midgley PA, Bengoa JF, Cagnoli MV, Gallegos NG, Alvarez AM y Marchetti SG (2006). Highly anisotropic distribution of iron nanoparticles within MCM-41 Mesoporous Silica. *Micron* 37:52-56.

- Moro MA, Lopez MG, Gandía L, Michelena P y Garcia AG (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem* 185:243-248.
- Mulder P, Richard V, Compagnon P, Henry JP, Lallemand F, Clozel JP, Koen R, Mace B y Thuillez C (1997). Increased survival after long-term treatment with mibefradil, a selective T-channel calcium antagonist, in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 29:416-421.
- Mulder P, Richard V y Thuillez C (1998). Different effects of calcium antagonists in a rat model of heart failure. *Cardiology* 89 Suppl 1:33-37.
- Murphy TH, Worley PF y Baraban JM (1991). L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7:625-635.
- Nashchekin D, Masich S, Soop T, Kukalev A, Kovrigina E, Nashchekina O y Daneholt B (2007). Two splicing isoforms of the Y-box protein ctYB-1 appear on the same mRNA molecule. *FEBS J* 274:202-211.
- Neely A y Lingle CJ (1992). Two components of calcium-activated potassium current in rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 453:97-131.
- Neher E (1995). The use of fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharmacology* 34:1423-1442.
- Nelson MT (1986). Interactions of divalent cations with single calcium channels from rat brain synaptosomes. *J Gen Physiol* 87:201-222.
- Newcomb R, Palma A, Fox J, Gaur S, Lau K, Chung D, Cong R, Bell JR, Horne B y Nadasdi L (1995a). SNX-325, a novel calcium antagonist from the spider *Segestria florentina*. *Biochemistry* 34:8341-8347.
- Newcomb R, Gaur S, Bell JR y Cruz L (1995b). Structural and biosynthetic properties of peptides in cone snail venoms. *Peptides* 16:1007-1017.
- Nicolau C, Legrand A y Grosse E (1987). Liposomes as carriers for *in vivo* gene transfer and expression. *Methods Enzymol* 149:157-176.
- Novalbos J, Abad-Santos F, Zapater P, Cano-Abad MF, Moradiellos J, Sanchez-Garcia P y Garcia AG (1999). Effects of dotarizine and flunarizine on chromaffin cell viability and cytosolic Ca²⁺. *Eur J Pharmacol* 366:309-317.
- Novina CD y Sharp PA (2004). The RNAi revolution. *Nature* 430:161-164.

- Nuglisch J, Karkoutly C, Mennel HD, Rossberg C y Krieglstein J (1990). Protective effect of nimodipine against ischemic neuronal damage in rat hippocampus without changing postischemic cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:654-659.
- Nunez L, de la Fuente MT, Garcia AG y Garcia-Sancho J (1995). Differential Ca²⁺ responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am J Physiol* 269:C1540-C1546.
- O'Farrell M, Ziogas J y Marley PD (1997). Effects of N- and L-type calcium channel antagonists and (+/-)-Bay K8644 on nerve-induced catecholamine secretion from bovine perfused adrenal glands. *Br J Pharmacol* 121:381-388.
- Ofek P, Fischer W, Calderon M, Haag R y Satchi-Fainaro R (2010). In vivo delivery of small interfering RNA to tumors and their vasculature by novel dendritic nanocarriers. *FASEB J* 24:3122-3134.
- Ohta T (1973). Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature* 246:96-98.
- Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J y Adams ME (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu Rev Biochem* 63:823-867.
- Olivera BM (1997). E.E. Just Lecture, 1996. Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology. *Mol Biol Cell* 8:2101-2109.
- Orozco C, Garcia-De-Diego AM, Arias E, Hernandez-Guijo JM, Garcia AG, Villarroya M y Lopez MG (2006). Depolarization preconditioning produces cytoprotection against veratridine-induced chromaffin cell death. *Eur J Pharmacol* 553:28-38.
- Osborne SL, Wen PJ, Boucheron C, Nguyen HN, Hayakawa M, Kaizawa H, Parker PJ, Vitale y Meunier FA (2008). PIKfyve negatively regulates exocytosis in neurosecretory cells. *J Biol Chem* 283:2804-2813.
- Ota M, Narahashi T y Keeler RF (1973). Effects of veratrum alkaloids on membrane potential and conductance of squid and crayfish giant axons. *J Pharmacol Exp Ther* 184:143-154.
- Paleos CM, Tsiourvas D y Sideratou Z (2007). Molecular engineering of dendritic polymers and their application as drug and gene delivery systems. *Mol Pharm* 4:169-188.
- Pan B, Cui D, Sheng Y, Ozkan C, Gao F, He R, Li Q, Xu P y Huang T (2007). Dendrimer-modified magnetic nanoparticles enhance efficiency of gene delivery system. *Cancer Res* 67:8156-8163.

- Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, Kostarelos K y Bianco A (2004). Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* 43:5242-5246.
- Park YS, Hur EM, Choi BH, Kwak E, Jun DJ, Park SJ y Kim KT (2006). Involvement of protein kinase C-epsilon in activity-dependent potentiation of large dense-core vesicle exocytosis in chromaffin cells. *J Neurosci* 26:8999-9005.
- Patterson PH (1990). Control of cell fate in a vertebrate neurogenic lineage. *Cell* 62:1035-1038.
- Pauwels PJ, van Assouw HP y Leysen JE (1989). Attenuation of neurotoxicity following anoxia or glutamate receptor activation in EGF- and hippocampal extract-treated neuronal cultures. *Cell Signal* 1:45-54.
- Pavan GM, Monteagudo S, Guerra J, Carrion B, Ocana V, Rodriguez-Lopez J, Danani A, Perez-Martinez FC y Cena V (2012). Role of Generation, Architecture, pH and Ionic Strength on Successful siRNA Delivery and Transfection by Hybrid PPV-PAMAM Dendrimers. *Curr Med Chem*.
- Perchenet y Clement-Chomienne O (2000). Characterization of mibefradil block of the human heart delayed rectifier hKv1.5. *J Pharmacol Exp Ther* 295:771-778.
- Perez-Carrion MD, Perez-Martinez FC, Merino S, Sanchez-Verdu P, Martinez-Hernandez J, Lujan R y Ceña V (2012). Dendrimer-mediated siRNA delivery knocks down Beclin 1 and potentiates NMDA-mediated toxicity in rat cortical neurons. *J Neurochem* 120:259-268.
- Perez-Martinez FC, Guerra J, Posadas I y Cena V (2011) Barriers to non-viral vector-mediated gene delivery in the nervous system. *Pharm Res* 28:1843-1858.
- Perez-Martinez FC, Ocaña AV, Perez-Carrion MD y Ceña V (2012a). Dendrimers as Vectors for Genetic Material Delivery to the Nervous System. *Curr Med Chem*.19:5101-5108.
- Perez-Martinez FC, Carrion B, Lucio MI, Rubio N, Herrero MA, Vazquez E y Ceña V (2012b). Enhanced docetaxel-mediated cytotoxicity in human prostate cancer cells through knockdown of cofilin-1 by carbon nanohorn delivered siRNA. *Biomaterials* 33:8152-8159.
- Perez-Martinez FC, Carrion B y Ceña V (2012c). The use of nanoparticles for gene therapy in the nervous system. *J Alzheimers Dis* 31:697-710.
- Pettmann B y Henderson CE (1998). Neuronal cell death. *Neuron* 20:633-647.

- Piser TM, Lampe RA, Keith RA y Thayer SA (1994). Omega-Grammotoxin blocks action-potential-induced Ca^{2+} influx and whole-cell Ca^{2+} current in rat dorsal-root ganglion neurons. *Pflugers Arch* 426:214-220.
- Piser TM, Lampe RA, Keith RA y Thayer SA (1995). Complete and reversible block by omega-grammotoxin SIA of glutamatergic synaptic transmission between cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 201:135-138.
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H y Striessnig J (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca^{2+} channels. *Cell* 102:89-97.
- Posadas I, Lopez-Hernandez B, Clemente MI, Jimenez JL, Ortega P, de la Mata J, Gomez R, Munoz-Fernandez MA y Ceña V (2009). Highly efficient transfection of rat cortical neurons using carbosilane dendrimers unveils a neuroprotective role for HIF-1alpha in early chemical hypoxia-mediated neurotoxicity. *Pharm Res* 26:1181-1191.
- Posadas I, Guerra FJ y Cena V (2010) Nonviral vectors for the delivery of small interfering RNAs to the CNS. *Nanomedicine (Lond)* 5:1219-1236.
- Posadas I, Perez-Martinez FC, Guerra J, Sanchez-Verdu P y Ceña V (2012). Cofilin activation mediates Bax translocation to mitochondria during excitotoxic neuronal death. *J Neurochem* 120:515-527.
- Prausnitz MR, Mitragotri S y Langer R (2004). Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 3:115-124.
- Putral LN, Gu W y McMillan NA (2006). RNA interference for the treatment of cancer. *Drug News Perspect* 19:317-324.
- Rajakulendran S, Kaski D y Hanna MG (2012). Neuronal P/Q-type calcium channel dysfunction in inherited disorders of the CNS. *Nat Rev Neurol* 8:86-96.
- Raoul C, Barker SD y Aebischer P (2006). Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* 13:487-495.
- Ribeiro P, Wang Y, Citron BA y Kaufman S (1992). Regulation of recombinant rat tyrosine hydroxylase by dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9593-9597.
- Robinson IM, Finnegan JM, Monck JR, Wightman RM y Fernandez JM (1995). Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2474-2478.

- Rodrigo AC, Rivilla I, Perez-Martinez FC, Monteagudo S, Ocana V, Guerra J, Garcia-Martinez JC, Merino S, Sanchez-Verdu P, Ceña V y Rodriguez-Lopez J (2011). Efficient, non-toxic hybrid PPV-PAMAM dendrimer as a gene carrier for neuronal cells. *Biomacromolecules* 12:1205-1213.
- Romanin C, Seydl K, Glossmann H y Schindler H (1992). The dihydropyridine nifedipine inhibits T-type Ca^{2+} currents in atrial myocytes. *Pflugers Arch* 420:410-412.
- Rosa JM, de Diego AM, Gandia L y Garcia AG (2007). L-type calcium channels are preferentially coupled to endocytosis in bovine chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun* 357:834-839.
- Rothman SM y Olney JW (1986). Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.
- Roulet JB, Spaetgens RL, Burlingame T, Feng ZP y Zamponi GW (1999). Modulation of neuronal voltage-gated calcium channels by farnesol. *J Biol Chem* 274:25439-25446.
- Roux S, Buhler M y Clozel JP (1996). Mechanism of the antiischemic effect of mibefradil, a selective T calcium channel blocker in dogs: comparison with amlodipine. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:132-139.
- Sah DW (2006). Therapeutic potential of RNA interference for neurological disorders. *Life Sci* 79:1773-1780.
- Sala F, Fonteriz RI, Borges R y Garcia AG (1986). Inactivation of potassium-evoked adrenomedullary catecholamine release in the presence of calcium, strontium or BAY-K-8644. *FEBS Lett* 196:34-38.
- Santi CM, Darszon A y Hernandez-Cruz A (1996). A dihydropyridine-sensitive T-type Ca^{2+} current is the main Ca^{2+} current carrier in mouse primary spermatocytes. *Am J Physiol* 271:C1583-C1593.
- Saumet A y Lecellier CH (2006). Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? *Retrovirology* 3:3.
- Schlegel W, Winiger BP, Mollard P, Vacher P, Wuarin F, Zahnd GR, Wollheim CB y Dufy B (1987). Oscillations of cytosolic Ca^{2+} in pituitary cells due to action potentials. *Nature* 329:719-721.
- Sedlak TW y Snyder SH (2006). Messenger molecules and cell death: therapeutic implications. *JAMA* 295:81-89.

- Shapiro MS, Gomeza J, Hamilton SE, Hille B, Loose MD, Nathanson NM, Roche JP y Wess J (2001). Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca^{2+} and K^+ channel activity in sympathetic neurons. *Life Sci* 68:2481-2487.
- Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, Potapovich AI, Tyurina YY, Gorelik O, Arepalli S, Schwegler-Berry D, Hubbs AF, Antonini J, Evans DE, Ku BK, Ramsey D, Maynard A, Kagan VE, Castranova V y Baron P (2005). Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L698-L708.
- Sidach SS y Mintz IM (2000). Low-affinity blockade of neuronal N-type Ca channels by the spider toxin omega-agatoxin-IVA. *J Neurosci* 20:7174-7182.
- Sidach SS y Mintz IM (2002). Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold Ca channels. *J Neurosci* 22:2023-2034.
- Siegelbaum SA y Tsien RW (1980). Calcium-activated transient outward current in calf cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 299:485-506.
- Siesjo BK (1992). The ionic basis of neurocytotoxic damage. *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A:128A-129A.
- Sihra TS, Scott IG y Nicholls DG (1984). Ionophore A23187, verapamil, protonophores, and veratridine influence the release of gamma-aminobutyric acid from synaptosomes by modulation of the plasma membrane potential rather than the cytosolic calcium. *J Neurochem* 43:1624-1630.
- Small DL y Buchan AM (1996). Mechanisms of cerebral ischemia: intracellular cascades and therapeutic interventions. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 10:139-146.
- Small DL, Monette R, Buchan AM y Morley P (1997). Identification of calcium channels involved in neuronal injury in rat hippocampal slices subjected to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res* 753:209-218.
- Snutch TP (2005). Targeting chronic and neuropathic pain: the N-type calcium channel comes of age. *NeuroRx* 2:662-670.
- Stennicke HR y Salvesen GS (1999). Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* 6:1054-1059.
- Suk JS, Suh J, Choy K, Lai SK, Fu J y Hanes J (2006). Gene delivery to differentiated neurotypic cells with RGD and HIV Tat peptide functionalized polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 27:5143-5150.

- Svenson S y Tomalia DA (2005). *Dendrimers in biomedical applications--reflections on the field. Adv Drug Deliv Rev 57:2106-2129.*
- Swandulla D, Carbone E y Lux HD (1991). *Do calcium channel classifications account for neuronal calcium channel diversity? Trends Neurosci 14:46-51.*
- Takei N, Tsukui H y Hatanaka H (1989). *Intracellular storage and evoked release of acetylcholine from postnatal rat basal forebrain cholinergic neurons in culture with nerve growth factor. J Neurochem 53:1405-1410.*
- Takeshita F y Ochiya T (2006). *Therapeutic potential of RNA interference against cancer. Cancer Sci 97:689-696.*
- Takizawa S, Matsushima K, Fujita H, Nanri K, Ogawa S y Shinohara Y (1995). *A selective N-type calcium channel antagonist reduces extracellular glutamate release and infarct volume in focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 15:611-618.*
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T y Numa S (1987). *Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. Nature 328:313-318.*
- Tapia L, Eguiagaray JG, Egea J, Garcia AG y Gandia L (2006). *Enhancement of secretion by threshold nicotinic stimulation in bovine chromaffin cells. J Mol Neurosci 30:81-82.*
- Tomalia DA (1991). *Dendrimer research. Science 252:1231.*
- Tottene A, Moretti A y Pietrobon D (1996). *Functional diversity of P-type and R-type calcium channels in rat cerebellar neurons. J Neurosci 16:6353-6363.*
- Truong-Le VL, Walsh SM, Schweibert E, Mao HQ, Guggino WB, August JT y Leong KW (1999). *Gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. Arch Biochem Biophys 361:47-56.*
- Trushina E y McMurray CT (2007). *Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. Neuroscience 145:1233-1248.*
- Tsien RW y Tsien RY (1990). *Calcium channels, stores, and oscillations. Annu Rev Cell Biol 6:715-760.*
- Tsien RW, Ellinor PT y Horne WA (1991). *Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. Trends Pharmacol Sci 12:349-354.*

- Turner TJ, Lampe RA y Dunlap K (1995). Characterization of presynaptic calcium channels with omega-conotoxin MVIIC and omega-gammatoxin SIA: role for a resistant calcium channel type in neurosecretion. *Mol Pharmacol* 47:348-353.
- Tuschl T y Borkhardt A (2002). Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2:158-167.
- Tuting T (1999). The immunology of cutaneous DNA immunization. *Curr Opin Mol Ther* 1:216-225.
- Uceda G, Artalejo AR, de la Fuente MT, Lopez MG, Albillos A, Michelena P, Garcia AG y Montiel C (1994). Modulation by L-type Ca^{2+} channels and apamin-sensitive K^+ channels of muscarinic responses in cat chromaffin cells. *Am J Physiol* 266:C1432-C1439.
- Unsicker K, Griesser GH, Lindmar R, Loffelholz K y Wolf U (1980). Establishment, characterization and fibre outgrowth of isolated bovine adrenal medullary cells in long-term cultures. *Neuroscience* 5:1445-1460.
- Vacher E, Richer C, Fornes P, Clozel JP y Giudicelli (1996). Mibefradil, a selective calcium T-channel blocker, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 27:686-694.
- Vader P, van der Aa LJ, Engbersen JF, Storm G y Schiffelers RM (2012). Physicochemical and biological evaluation of siRNA polyplexes based on PEGylated Poly(amido amine)s. *Pharm Res* 29:352-361.
- Valentino K, Newcomb R, Gadbois T, Singh T, Bowersox S, Bitner S, Justice A, Yamashiro D, Hoffman BB y Ciaranello R (1993). A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7894-7897.
- Valero T, del BL, Egea J, Canas N, Martinez A, Garcia AG, Villarroya M y Lopez MG (2009). NP04634 prevents cell damage caused by calcium overload and mitochondrial disruption in bovine chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 607:47-53.
- Viana F, Van den Bosch L, Missiaen L, Vandenberghe W, Droogmans G, Nilius B y Robberecht W (1997). Mibefradil (Ro 40-5967) blocks multiple types of voltage-gated calcium channels in cultured rat spinal motoneurons. *Cell Calcium* 22:299-311.
- Villarroya M, Olivares R, Ruiz A, Cano-Abad MF, de PR, Lomax RB, Lopez MG, Mayorgas I, Gandía L y Garcia AG (1999). Voltage inactivation of Ca^{2+} entry and secretion

associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca^{2+} channels of bovine chromaffin cells. *J Physiol* 516 (Pt 2):421-432.

Wang J, Lee IL, Lim WS, Chia SM, Yu H, Leong KW y Mao HQ (2004). Evaluation of collagen and methylated collagen as gene carriers. *Int J Pharm* 279:115-126.

Weber N, Ortega P, Clemente MI, Shcharbin D, Bryszewska M, de la Mata FJ, Gomez R y Munoz-Fernandez MA (2008). Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J Control Release* 132:55-64.

Weinsberg F, Bickmeyer U y Wiegand H (1994). Effects of tetrandrine on calcium channel currents of bovine chromaffin cells. *Neuropharmacology* 33:885-890.

Wen PJ, Osborne SL, Morrow IC, Parton RG, Domin J y Meunier FA (2008). Ca^{2+} -regulated pool of phosphatidylinositol-3-phosphate produced by phosphatidylinositol 3-kinase C2alpha on neurosecretory vesicles. *Mol Biol Cell* 19:5593-5603.

Westenbroek RE, Hoskins L y Catterall WA (1998a). Localization of Ca^{2+} channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci* 18:6319-6330.

Westenbroek RE, Bausch SB, Lin RC, Franck JE, Noebels JL y Catterall WA (1998b). Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in reactive astrocytes after brain injury, hypomyelination, and ischemia. *J Neurosci* 18:2321-2334.

Wheeler DB, Randall A y Tsien RW (1994). Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264:107-111.

Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB y Harpold MM (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8:71-84.

Wilson SP (1987). Reserpine increases chromaffin cell enkephalin stores without a concomitant decrease in other proenkephalin-derived peptides. *J Neurochem* 49:1550-1556.

Woods NM, Cuthbertson KS y Cobbold PH (1986). Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319:600-602.

Wu H, Liu Z, Wang X, Zhao B, Zhang J y Li C (2006). Preparation of hollow capsule-stabilized gold nanoparticles through the encapsulation of the dendrimer. *J Colloid Interface Sci* 302:142-148.

- Wu LG y Saggau P (1994). *Pharmacological identification of two types of presynaptic voltage-dependent calcium channels at CA3-CA1 synapses of the hippocampus. J Neurosci* 14:5613-5622.
- Yamada K, Teraoka T, Morita S, Hasegawa y, Nabeshima T (1994a). *Omega-conotoxin GVIA protects against ischemia-induced neuronal death in the Mongolian gerbil but not against quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat. Neuropharmacology* 33:251-254.
- Yamada K, Teraoka T, Morita S, Hasegawa T y Nabeshima T (1994b). *Omega-conotoxin GVIA inhibits the methylphenidate-induced but not methamphetamine-induced behavior. Neurosci Lett* 165:191-194.
- Yokoo H, Shiraishi S, Kobayashi H, Yanagita T, Yamamoto R y Wada A (1998). *Selective inhibition by riluzole of voltage-dependent sodium channels and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:526-531.
- Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberle AM, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader MF y Vitale N (2007). *Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. J Biol Chem* 282:21746-21757.
- Zhang X, Zhang H, Wu Z, Wang Z, Niu H y Li C (2008). *Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. Eur J Pharm Biopharm* 68:526-534.
- Zhao Q, Smith ML y Siesjo BK (1994). *The omega-conopeptide SNX-111, an N-type calcium channel blocker, dramatically ameliorates brain damage due to transient focal ischaemia. Acta Physiol Scand* 150:459-461.
- Zou K, Liu J, Zhu N, Lin J, Liang Q, Brown WT, Shen Y y Zhong N (2008). *Identification of FMRP-associated mRNAs using yeast three-hybrid system. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:769-777.
- Zuhorn IS, Kalicharan D, Robillard GT y Hoekstra D (2007). *Adhesion receptors mediate efficient non-viral gene delivery. Mol Ther* 15:946-953.

