

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**MECANISMOS IMPLICADOS EN EL EFECTO CARDIACO
DEL NEUROPEPTIDO Y**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María del Puy Heredia Ochoa

Bajo la dirección de las doctoras

Carmen Delgado Canencia
Ana María Gómez García

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2032-3

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacología



**“Mecanismos implicados en el efecto cardíaco del
Neuropéptido Y”**

María del Puy Heredia Ochoa

Madrid, 2002

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacología



**“Mecanismos implicados en el efecto cardíaco del
Neuropéptido Y”**

Memoria presentada por la Licenciada María del Puy Heredia

Ochoa para aspirar al Grado de Doctor.

Directores:

Dra. Carmen Delgado Canencia

Dra. Ana María Gómez García

Tutora:

Dra. Juana Benedí González

*"Es justamente la posibilidad de realizar un
sueño
lo que hace que la vida sea interesante".*

Paulo Coelho, "El alquimista".

A mi familia

*A la memoria de Ángela,
Pepa y Matilde*

A Javi

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Pedro Lorenzo por permitir la realización de la presente Tesis Doctoral en el Departamento de Farmacología y Toxicología que él dirige.

Al Dr. Ángel María Villar del Fresno por aceptar la lectura de este trabajo a través del Departamento de Farmacología, donde me inicié en la investigación básica.

Deseo expresar mi gratitud a la Prof. Juana Benedí González, quien ha aceptado gustosa ser Tutora de esta Tesis Doctoral, por su disponibilidad y ayuda siempre que ha sido necesaria.

Quisiera agradecer a la Dra. Carmen Delgado, Directora de esta Tesis Doctoral, la formación integral que me ha ofrecido y por el trato amistoso, comprensivo y sincero que me ha brindado durante todos estos años.

Agradezco a la Unidad 390 del INSERM (Montpellier, Francia), por acogerme durante dos estancias cortas. Mi más sincero agradecimiento al Dr. Guy Vassort, director de la unidad, por la amabilidad con que me trató durante todo el tiempo que pasé allí.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Ana María Gómez, codirectora de esta Tesis, por su inestimable ayuda y apoyo prestado no sólo en el ámbito científico sino también en el personal. Gracias por enseñarme tantas cosas, por convertir lo complejo en sencillo y contribuir a una parte esencial de esta Tesis.

Me gustaría expresar mi gratitud a todo el personal de la Unidad 390, especialmente agradecer su ayuda y buenos consejos a Sylvain Richard, Jean-Pierre Bénitah, Julio Álvarez, Jana Hamplova, Benoit Kerfant, Michèle Benoit y Patrice Bideaux, a quienes conocí durante mi estancia en Montpellier y con los que pasé muy buenos ratos.

Agradezco a la Comunidad de Madrid la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, que permitió la realización de esta Tesis Doctoral.

Deseo dar las gracias a todos los becarios del Departamento por los buenos ratos pasados dentro (especialmente durante las comidas) y fuera del laboratorio y el apoyo ofrecido en los momentos malos. En especial, agradecer su constante apoyo y amistad a Jorge de Alba, Esther O'Shea, Javier de Cristóbal, Blanca Esteban, Jorge Camarero, Verónica Sánchez, Mariu Padilla y Miriam Zeini.

Agradezco a mis compañeras de grupo actuales, María Fernández y Gemma Benito, la ayuda y el interés mostrado en esta Tesis Doctoral. Especialmente, le doy las

gracias a las Dras. M^a Luisa Martínez y Loipa Galán por enseñarme las técnicas básicas de la electrofisiología cardíaca y por conservar con ellas una gran amistad.

Quisiera agradecer a los laboratorios Boehringer-Ingelheim y en especial a Francisco Aguado por haberme facilitado desinteresadamente los antagonistas específicos de los receptores de NPY. Herramienta farmacológica que fue de mucha utilidad y gracias a la que este trabajo pudo finalizarse de forma exitosa. Agradecer también a la Dra. Dolores Prieto su amabilidad al probar en su modelo experimental los efectos del neuropéptido Y.

Deseo expresar mi gratitud a M^a Elena Vicente e Isabel Ocaña por la excelente labor administrativa que desempeñan y a Manuel Bas, M^a Luisa Hidalgo, Fernando Ortega, Manuel Solís, Óscar Grijota y María Herrera por su excelente ayuda técnica.

Agradezco a la Dra. Belén Fernández Puntero su amistad y apoyo en los momentos difíciles, por su gran capacidad de escuchar y por encontrar siempre la palabra justa para darme ánimos (¡gracias bonita!).

Mi agradecimiento más sincero a todos mis amigos que me han apoyado y escuchado durante estos años de largos días de trabajo.

Quisiera expresar mi gratitud a Rafael, Angelines y Enrique por la ayuda técnica y moral prestada durante la última fase de escritura de esta Tesis Doctoral.

Finalmente, quiero dar las gracias a mis padres por el apoyo constante durante estos años. Por supuesto, a Raquel, a Héctor y a mi “sobri” Pablo. Gracias a ellos las cosas siempre son más sencillas.

A todos los que habéis estado a mi lado os hago partícipes de esta Tesis Doctoral y os reitero mi más sincero agradecimiento.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura de las células y organelas del corazón.....	2
1.1.1. Estructura de los miocitos cardíacos.....	3
1.1.1.1. Estructuras internas.....	4
➤ Citosol.....	4
➤ Miofibrillas y proteínas contráctiles.....	5
➤ El citoesqueleto.....	8
➤ Las mitocondrias.....	9
➤ El retículo sarcoplásmico.....	10
➤ El núcleo.....	12
1.1.1.2. Estructuras externas.....	12
➤ Sarcolema y glicocáliz.....	12
➤ Sistema tubular transverso (túbulos T).....	14
➤ Canales iónicos.....	14
➤ Tejido conectivo cardíaco.....	17
➤ Comunicación entre cardiomiocitos.....	18
1.2. Fisiología de los miocitos cardíacos.....	18
1.2.1. Potencial de acción cardíaco.....	18
1.2.2. Corrientes iónicas implicadas en el PA.....	22
1.2.2.1. Corriente de Na ⁺	23
1.2.2.2. Corrientes de Ca ²⁺	23
1.2.2.3. Corrientes de potasio.....	26
1.2.2.4. Corrientes de cloro.....	29
1.2.2.5. Corriente hiperpolarizante.....	30
1.2.3. Acoplamiento excitación-contracción cardíaco.....	30
1.2.3.1. Teoría de control local de calcio.....	31
1.2.3.2. Mecanismos de activación del RS.....	33
➤ I _{CaL}	33
➤ Otras vías de entrada.....	34
1.2.3.3. Papel de RS en el acoplamiento E-C.....	35
1.2.3.4. Eliminación del Ca ²⁺ después de la contracción.....	36
1.3. Neuropéptido Y (NPY).....	39
1.3.1. Aspectos generales.....	39
1.3.1.1. Descubrimiento.....	39
1.3.1.2. Estructura.....	40
1.3.1.3. Biosíntesis del NPY.....	41
1.3.1.4. Distribución del NPY en el organismo.....	42
1.3.1.5. Efectos directos e indirectos del NPY.....	43
1.3.2. Receptores de NPY.....	44
1.3.2.1. Receptores Y ₁	46
1.3.2.2. Receptores Y ₂	48
1.3.2.3. Receptores Y ₃	48
1.3.2.4. Receptores Y ₄	48
1.3.2.5. Receptores Y ₅	49
1.3.2.6. Receptores y ₆	49
1.3.3. Relevancia fisiológica y patológica del NPY.....	50
1.3.3.1. Efectos centrales del NPY.....	50
➤ Regulación del apetito.....	50
➤ Efecto ansiolítico y sedante.....	53
➤ Regulación del aprendizaje y la memoria.....	54

➤ Efectos analgésicos del NPY.....	54
1.3.3.2. Efectos periféricos del NPY.....	55
1.3.3.3. Efectos cardiovasculares del NPY.....	55
➤ Distribución del NPY en el sistema cardiovascular.....	55
➤ Efectos cardiovasculares a nivel central.....	56
➤ Efectos periféricos del NPY en el sistema cardiovascular.....	56
<i>Efectos vasculares</i>	56
<i>Efectos en el corazón</i>	59
➤ Implicaciones patológicas del NPY en el sistema cardiovascular.....	62
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	65
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
3.1. Técnica de disociación de miocitos cardíacos de rata.....	70
3.1.1. Fundamento y puntualizaciones de la técnica.....	70
3.1.2. Soluciones.....	71
3.1.3. Protocolo experimental.....	72
3.2. Técnicas de fluorescencia.....	73
3.2.1. Descripción del fenómeno de fluorescencia	73
3.2.2. Espectros fluorescentes.....	74
3.2.3. Detección fluorescente.....	75
3.2.3.1. Fluoróforos.....	76
➤ Medidas de calcio con indicadores fluorescentes.....	76
<i>Fluo-3</i>	77
3.2.4. Equipos utilizados.....	78
3.2.4.1. Descripción del microscopio de epifluorescencia.....	78
3.2.4.2. Descripción del microscopio confocal.....	79
3.2.5. Soluciones y productos químicos.....	81
3.2.5.1. Solución de registro.....	81
3.2.6. Protocolos experimentales: transientes de calcio.....	81
3.2.6.1. Preparación y carga del fluo-3.....	81
3.2.6.2. Transiente de calcio global.....	82
3.2.6.3. Transiente de calcio local.....	84
3.3. Técnicas electrofisiológicas.....	86
3.3.1. Técnica de <i>patch-clamp</i>	86
3.3.1.1. Configuraciones de patch-clamp.....	87
➤ On-cell-patch o cell-attached.....	87
➤ Configuración de célula entera o “whole-cell”.....	88
➤ Configuración de parche perforado.....	90
➤ Inside-out patch.....	92
➤ Outside-out patch.....	92
3.3.2. Equipo utilizado.....	92
3.3.3. Soluciones.....	93
3.3.3.1. Soluciones externas.....	94
➤ Solución externa utilizada para el registro de la I_{CaL}	94
➤ Solución de I_{to} en la configuración de célula entera.....	94
➤ Solución de I_{to} en la configuración de parche perforado.....	95
3.3.3.2. Soluciones internas.....	96

➤ Solución de I_{CaL} en la configuración de célula entera.....	96
➤ Solución de I_{CaL} en la configuración de parche perforado.....	97
➤ Solución de I_{to} en la configuración de célula entera.....	99
➤ Solución de I_{to} en la configuración de parche perforado.....	99
3.3.3.3. Productos químicos y fármacos.....	100
➤ Preparación de Anfotericina B.....	100
➤ Preparación del NPY.....	101
➤ Preparación de los antagonistas selectivos del receptor Y_1 e Y_2	101
3.3.4. Protocolos experimentales	102
3.3.4.1. Protocolo experimental para la obtención de la configuración de célula entera.....	102
3.3.4.2. Protocolo experimental para la obtención de la configuración de parche perforado.....	103
3.3.4.3. Medida de la capacitancia y resistencias en serie.....	103
3.3.4.4. Protocolo experimental para el registro de I_{CaL}	105
3.3.4.5. Protocolo experimental para el registro de I_{to}	106
3.4. Análisis estadístico	108
4. RESULTADOS	109
4.1. Estudios de fluorescencia	110
4.1.1. Modulación de la señalización de Ca^{2+} por NPY	110
4.1.1.1 Efecto del NPY (100 nm) sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$	111
4.1.1.2. Efecto de NPY (100 nm) sobre los <i>sparks</i> de Ca^{2+}	117
4.1.2. Mecanismos de transducción implicados en el efecto de NPY sobre el acoplamiento E-C	121
4.1.2.1. Estudio del receptor de NPY implicado.....	122
4.1.2.2. Implicación de las proteínas G sensibles a PTX en el efecto de NPY sobre la señalización de Ca^{2+}	123
4.1.2.3. Implicación de las PKA en el efecto del NPY sobre la señalización de Ca^{2+}	124
4.2. Estudios electrofisiológicos	126
4.2.1. Efecto del NPY en la corriente de calcio tipo L (I_{CaL}) en células ventriculares de rata	126
4.2.2. Estudio del receptor involucrado en el efecto del NPY sobre la I_{CaL}	132
4.2.3. Estudio del posible efecto antiadrenérgico del NPY	134
4.2.4. Estudio de la $I_{to(4-AP)}$ en células ventriculares de rata	136
4.2.4.1. Curva dosis-respuesta.....	140
4.2.5. Mecanismo de acción implicado en el aumento de la $I_{to(4-AP)}$ por NPY	142
4.2.5.1. Estudio del receptor de NPY implicado.....	142
4.2.5.2. Implicación de las proteínas G sensibles a PTX en la cascada de transducción del efecto del NPY sobre $I_{to(4-ap)}$	144

4.2.5.3. Implicación de la PKC en el efecto de NPY sobre la $I_{to(4-AP)}$	145
5. DISCUSIÓN.....	148
6. CONCLUSIONES.....	166
7. BIBLIGRAFÍA.....	168

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Células del corazón.....	2
Figura 2.	Imagen obtenida de un miocito ventricular de rata en un microscopio confocal.....	3
Figura 3.	Esquema de la situación de las proteínas contráctiles en la fase de relajación.....	5
Figura 4.	Miofibrillas y sarcómeras.....	6
Figura 5.	Interacción de los filamentos de actina y miosina para producir la contracción.....	7
Figura 6.	Representación esquemática de una diada.....	10
Figura 7.	Esquema básico de la estructura de la membrana celular.....	13
Figura 8.	Representación esquemática de los posibles estados en que se puede encontrar un canal.....	16
Figura 9.	Esquema de un PA cardíaco y de las corrientes implicadas en cada fase del mismo.....	21
Figura 10:	Esquema general del ciclo del Ca^{2+} en un miocito cardíaco.....	32
Figura 11.	Esquema de la estructura del NPY porcino.....	41
Figura 12.	Tipos de interacciones sinápticas de NT y NPY.....	43
Figura 13.	Esquema simplificado de la cascada intracelular de la enzima A-C.....	45
Figura 14.	Esquema general de la cascada intracelular de la PLC.....	46
Figura 15.	Diagrama Jablonski.....	74
Figura 16.	Espectro fluorescente del fluo-3.....	75
Figura 17.	Esquema general de un microscopio de epifluorescencia.....	78
Figura 18.	Esquema del fundamento para la detección fluorescente en un microscopio confocal.....	79
Figura 19.	Esquema básico de la obtención de una imagen de <i>sparks</i> de Ca^{2+} en un microscopio confocal mediante barrido de línea.....	80
Figura 20.	Ejemplo representativo de un transiente de $[Ca^{2+}]_i$ obtenido en el microscopio de epifluorescencia.....	83
Figura 21.	Ejemplos de imágenes de barrido de línea y transientes obtenidas en el microscopio confocal.....	84
Figura 22.	Esquema de las configuraciones de la técnica de patch-clamp.....	88
Figura 23.	Esquema básico de un equipo de patch-clamp.....	93
Figura 24.	Ejemplo de un trazo de capacitancia celular y los parámetros para su correcto análisis.....	104

Figura 25.	Ejemplo de un trazo de I_{CaL} a -10 mV y los parámetros para su análisis.....	106
Figura 26.	Ejemplo de trazo de I_{to} a $+40$ mV y los parámetros para su correcto análisis.....	107
Figura 27.	Efecto del NPY sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ a distintos tiempos.....	111
Figura 28.	El NPY aumenta la amplitud del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$	112
Figura 29.	El NPY acelera la cinética del transiente de $[Ca^{2+}]_i$	113
Figura 30.	El NPY incrementa el porcentaje de contracción en células ventriculares de rata.....	113
Figura 31.	El NPY modifica el acoplamiento E-C.....	114
Figura 32.	Trazos de $[Ca^{2+}]_i$ evocados por la cafeína.....	116
Figura 33.	El NPY aumenta la carga de Ca^{2+} del RS de células ventriculares.....	117
Figura 34.	El NPY modifica la amplitud de los <i>sparks</i> de Ca^{2+}	118
Figura 35.	El NPY aumenta la amplitud de los <i>sparks</i> de Ca^{2+}	119
Figura 36.	El NPY no modifica la constante de tiempo de relajación ni la anchura media de los <i>sparks</i> de Ca^{2+}	120
Figura 37.	La frecuencia de los <i>sparks</i> de Ca^{2+} aumenta después del tratamiento con NPY.....	121
Figura 38.	El receptor Y_2 no está implicado en la modificación del transiente global de Ca^{2+} inducida por NPY.....	122
Figura 39.	El receptor Y_1 es el responsable del aumento del transiente global de Ca^{2+} inducido por NPY.....	123
Figura 40.	El efecto de NPY es independiente de la cascada de las proteínas G sensibles a PTX.....	124
Figura 41.	El tratamiento con NPY previene los efectos de ISO 100 nM.....	125
Figura 42.	Trazos representativos de I_{CaL} en la configuración de célula entera.....	127
Figura 43.	El NPY disminuye la I_{CaL} , en la configuración de célula entera.....	128
Figura 44.	Estudio del <i>run-down</i> de calcio.....	129
Figura 45.	El efecto del NPY sobre la I_{CaL} , en la configuración de célula entera, está sobrestimado debido al <i>run-down</i>	130
Figura 46.	Trazos representativos de I_{CaL} en la configuración	

	de parche perforado.....	131
Figura 47.	El NPY disminuye la I_{CaL} , en la configuración de parche perforado.....	132
Figura 48.	El efecto de NPY sobre la I_{CaL} es inespecífico del subtipo de receptor.....	133
Figura 49.	Efecto del NPY (100 nM) cuando la I_{CaL} se estimuló con ISO (1 μ M).....	134
Figura 50.	El NPY no modifica la I_{CaL} previamente estimulada con ISO.....	135
Figura 51.	La perfusión con NPY 100 nM, durante 4 minutos, no modifica la I_{to}	137
Figura 52.	La incubación con NPY 100 nM (3-6 horas) modifica la I_{to} y la $I_{to(4AP)}$ en miocitos apicales de corazones de rata.....	139
Figura 53.	La incubación con 100 nM de NPY (3-6 horas) aumenta la I_{to}	139
Figura 54.	La incubación con NPY 100 nM modifica la $I_{to(4AP)}$	140
Figura 55.	El aumento inducido por el NPY, en la $I_{to(4AP)}$ es dependiente de la concentración.....	141
Figura 56.	El receptor Y_1 no está implicado en el efecto del NPY en la $I_{to(4AP)}$	143
Figura 57.	El receptor Y_2 media el efecto del NPY sobre la $I_{to(4AP)}$	144
Figura 58.	Las proteínas G sensibles a PTX están implicadas en el efecto de NPY sobre $I_{to(4AP)}$	145
Figura 59.	La PKC media el aumento de $I_{to(4AP)}$ inducido por NPY.....	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Distribución iónica a ambos lados del sarcolema.....	4
Tabla 2.	Solución de registro utilizada en los experimentos de fluorescencia.....	81
Tabla 3.	Solución de registro de I_{CaL}	94
Tabla 4.	Solución de registro de I_{to} en la configuración de célula entera.....	95
Tabla 5.	Solución de registro de I_{to} en la configuración de parche perforado.....	96
Tabla 6.	Solución interna de I_{CaL} para la configuración de célula entera.....	97
Tabla 7.	Solución interna de I_{CaL} para la configuración de parche perforado.....	98
Tabla 8.	Solución interna para I_{to} en la configuración de célula entera.....	99
Tabla 9.	Solución interna para I_{to} en la configuración de parche perforado.....	100

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A-C:	Adenilato ciclasa
Ach:	Acetil-colina
ADNc:	Ácido desoxiribonucleico complementario
Ala:	Alanina
AMP _c :	Adenosín monofosfato cíclico
Arg:	Arginina
ARNm:	Ácido ácido mensajero
Asn:	Asparagina
Asp:	Ácido aspártico
ATP:	Adenosín trifosfato
4-AP:	4 aminopiridina
BIBP3226:	N2-(Difenilacetil)-N-[(4-hidroxi-fenil) metil]-D-arginina amida.
BIIE0246:	(R)-N [4-(aminocarbonilaminometil)-fenil]-N2-(difenilacetil)-argininamida trifluoroacetato
Ca ²⁺ :	Calcio
[Ca ²⁺] _i :	Concentración de calcio libre intracelular
CICR:	Liberación de calcio inducida por calcio
CPON:	Péptido que flanquea el carbono terminal del NPY
CRH:	Hormona corticotropina
DAG:	Diacilglicerol
DMSO:	Dimetil sulfóxido
E-C:	Excitación-contracción
EEM:	Error estándar de la media
EGTA:	Ácido etilén glicol <i>bis</i> (β-aminoetil éter) NNN'N' tetracético.
GABA:	Ácido γ-aminobutírico
Gln:	Glutamina
Glu:	Ácido glutámico
Gly:	Glicina
GTP:	Guanosín trifosfato
HEPES:	Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina N-[2-etansulfónico]
His:	Histidina
I _{CaL} :	Corriente de calcio tipo L
I _{Ca,TTX} :	Corriente de calcio sensible a TTX
I _f :	Corriente hiperpolarizante
I _K :	Corriente de rectificación retardada de potasio
I _{K(Ca)} :	Corriente de potasio activada por calcio
I _{Ks} :	Componente lento de la corriente de rectificación de potasio
I _{Kr} :	Componente rápido de la corriente de rectificación de potasio
I _{K(Ach)} :	Corriente rectificadora de entrada dependiente de acetil-colina
I _{K(ATP)} :	Corriente rectificadora de entrada dependiente de ATP
I _{K1} :	Corriente de rectificación de entrada
Ile:	Isoleucina
I _{Na} :	Corriente de sodio
IP ₃ :	Inositol trifosfato
I _{to} :	Corriente transitoria de potasio
I _{to (4-AP)} :	Corriente transitoria de potasio sensible a 4-AP
I _{to,f} :	Corriente transitoria de potasio de rápida inactivación
I _{to,s} :	Corriente transitoria de potasio de lenta inactivación

ISO:	Isoproterenol
K ⁺ :	Potasio
Leu:	Leucina
Lys:	Lisina
MAPK:	Proteín kinasa con actividad mitogénica
NA:	Noradrenalina
Na ⁺ :	Sodio
NPY:	Neuropéptido Y
NT:	Neurotransmisor
P _i :	Fosfato de alta energía
PA:	Potencial de acción
PF:	Potencial de fijación
PLC:	Fosfolipasa C
PKA:	Proteín kinasa A
PKC:	Proteín kinasa C
PP:	Polipéptido pancreático
Pro:	Prolina
Proteínas G _i :	Proteínas G inhibitorias
PTX:	Toxina pertussis
PY:	Péptido pancreático Y
PYY:	Hormona intestinal
RS:	Retículo sarcoplásmico
RyR:	Receptor de rianodina
Ser:	Serina
SERCA:	Bomba de Ca ²⁺ dependiente de ATP del Retículo Sarcoplásmico
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Sistema nervioso periférico
TEA:	Cloruro de tetraetilamonio
Thr:	Treonina
TTX:	Tetrodotoxina
Tyr:	Tirosina
vs.:	versus

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ESTRUCTURA DE LAS CÉLULAS Y ORGANELAS DEL CORAZÓN

El corazón está constituido, en su mayoría, por células musculares contráctiles, conocidas como cardiomiocitos, y por fibroblastos (células no contráctiles muy abundantes). El resto, lo constituyen tejidos marcapasos, tejidos conductores (que se relacionan con la generación y la propagación de la actividad eléctrica cardíaca), vasos sanguíneos, y el espacio extracelular (figura 1).

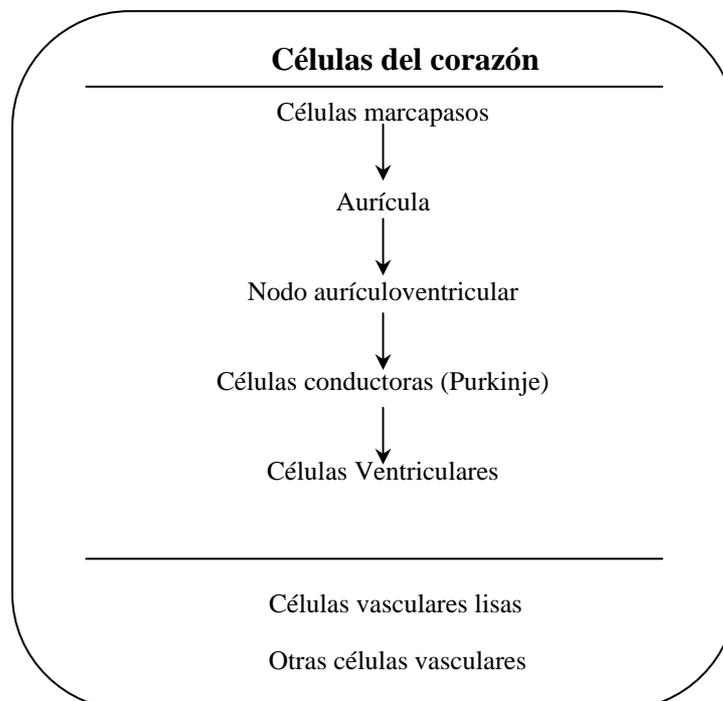


Figura 1. Células del corazón. El panel superior muestra las células implicadas en el inicio y conducción del impulso hacia las células ventriculares. El músculo liso vascular y otras células vasculares pueden regular la carga contra la que el corazón se contrae. (Tomado de Opie, 1998).

Los miocitos constituyen, aproximadamente, el 75 % del volumen total del miocardio y contienen haces de proteínas contráctiles, llamados miofibrillas. Un conjunto de miocitos, rodeado de tejido conectivo y colágeno, forma una miofibra.

1.1.1. ESTRUCTURA DE LOS MIOCITOS CARDÍACOS

Las células ventriculares tienen forma de ladrillo (figura 2) y su medida aproximada es de 10 a 25 μm de diámetro y de 50 a 100 μm de longitud (ver figura 21 de Material y Métodos para el tamaño). Por el contrario, las células de la aurícula son más pequeñas (10 μm de diámetro y 20 μm de longitud) y tienen forma de huso.

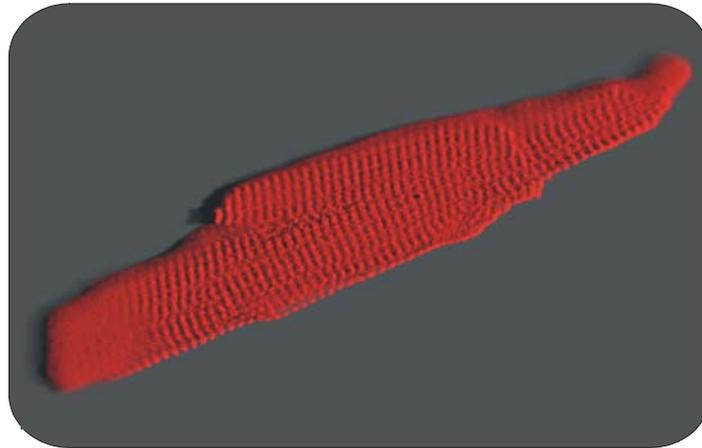


Figura 2. Imagen de un miocito ventricular de rata, obtenida en un microscopio confocal. (Cortesía de la Dra. A.M. Gómez, Montpellier, Francia).

Aunque es materia de polémica (Anversa y Kajstura, 1998; Anversa y cols., 2002), la hipótesis más aceptada es que los miocitos cardíacos son células de diferenciación terminal. Es decir, no pueden aumentar en número ni dividirse, una vez alcanzado el desarrollo. Por ello, al comienzo de la vida hay un vasto número de miocitos en el corazón (seis billones de células, aproximadamente) que se van perdiendo a lo largo de la vida.

Si se hace una descripción general de los componentes de las células cardíacas desde el interior al exterior, se podría decir que poseen, uno o varios núcleos que guardan la información genética. Al igual que otras células esqueléticas, estas células contienen gran número de proteínas contráctiles (miofibrillas) que se disponen espacialmente de forma muy simétrica, lo que proporciona a la célula una estructura estriada muy peculiar (figura 2). Las mitocondrias se encuentran adosadas a las miofibrillas y son las encargadas de mantener la función del corazón, mediante la producción de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP). También en el interior y con una estructura especializada, está presente el retículo sarcoplásmico (RS), cuya función principal es la de mantener la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) en el citoplasma.

En el exterior, cada miocito está limitado por una membrana externa denominada sarcolema (del latín *sarco*, flexible y *lemma*, caparazón fino). Esta membrana es peculiar, pues sufre invaginaciones, formando unos finos pasillos que extienden el espacio extracelular hacia el interior de la célula. Constituyen el sistema tubular o túbulos T. También es importante mencionar el citoesqueleto de las células pues está involucrado en procesos fundamentales, como la función contráctil, la adhesión celular, etc.

1.1.1.1. ESTRUCTURAS INTERNAS

➤ Citosol

El sarcolema separa el espacio intracelular del extracelular. En el espacio delimitado por dicha membrana hay un fluido con alto contenido iónico, denominado citosol, donde se encuentran el aparato contráctil y diversas organelas. El citosol, junto con las proteínas que se encuentran en él, conforman el citoplasma o sarcoplasma. El catión más abundante del interior de la célula es el potasio (K^+) (Tabla 1), que proporciona a las células cardíacas sus propiedades eléctricas específicas. La superficie interna del sarcolema está cargada negativamente, mientras que la cara externa tiene cargas positivas. También en el citosol es donde las concentraciones de Ca^{2+} oscilan induciendo la contracción y la relajación celular.

Tabla 1. Distribución iónica a ambos lados del sarcolema.		
	Composición intracelular (mM)	Composición extracelular (mM)
Sodio	5-34	140
Potasio	104-180	5,4
Cloro	8-79	100
Calcio	0,1	3

➤ Miofibrillas y proteínas contráctiles

La unidad contráctil fundamental es la sarcómera. Está compuesta por dos proteínas contráctiles, los filamentos gruesos de miosina y los filamentos finos de actina. La sarcómera está limitada por las líneas o discos Z (abreviatura del alemán *Zückung*, contracción) (figura 3) desde donde se proyectan los filamentos de actina, extendidos en ambas direcciones, para entrecruzarse con los de miosina. Inversamente, los filamentos de miosina se extienden desde el centro de la sarcómera sin llegar a alcanzar las bandas Z (figura 3). Dichos filamentos de miosina se unen a las líneas Z mediante una proteína conocida como titina. Ésta es una macromolécula de alto peso molecular que posee propiedades elásticas y contribuye al estiramiento mecánico del miocardio.

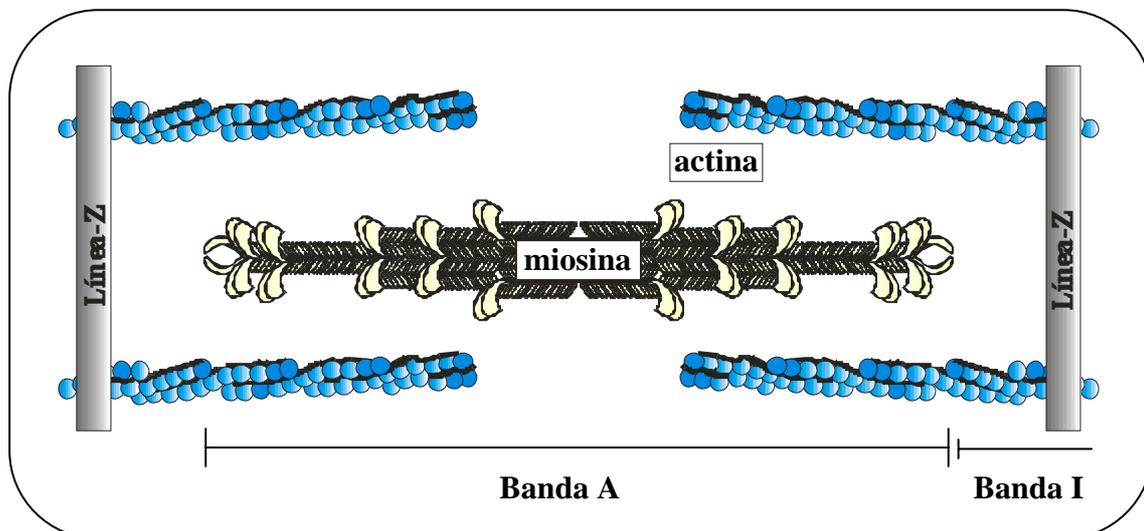


Figura 3. Esquema de la situación de las proteínas contráctiles en la fase de relajación. Los filamentos de miosina se proyectan desde el centro hacia ambos lados, situándose entre varios filamentos de actina. Durante la contracción cardíaca las cabezas de miosina interaccionan con los filamentos de actina para aproximar las líneas Z entre ellas. (Modificado de Opie, 1998).

Los lugares donde la actina y la miosina se solapan se denominan bandas anisotrópicas o bandas A, son zonas que aparecen oscuras en los ensayos de microscopía electrónica (figura 4). En contraposición, en estos ensayos también aparecen unas zonas claras o bandas isotrópicas (bandas I), que contienen sólo filamentos de actina. En el centro de cada banda A hay una zona más clara (figura 4) o banda H (también procedente del alemán *helle*, claro). En esa franja solamente hay miosina. A su vez, cada zona H contiene una parte más densa, denominada línea M (figura 4).

El filamento de miosina está formado por unas 200 moléculas de miosina. Cada molécula está formada a su vez, por dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras. Las cadenas pesadas se enrollan entre sí para formar una espiral doble (denominada cola), dejando libres los dos extremos de cada cadena para formar dos masas proteicas globulosas, denominada cabezas, donde se adosarán las cadenas ligeras (dos para cada cabeza). Para formar el filamento de miosina, las colas de las moléculas de miosina se agrupan entre sí dando lugar al cuerpo del filamento. Por los lados de este cuerpo cuelgan simultáneamente, una porción de la espiral (brazo) y las cabezas. Al conjunto, de brazo y cabeza, se le denomina puente cruzado. Son ellos los que interaccionan con la actina originando la contracción.

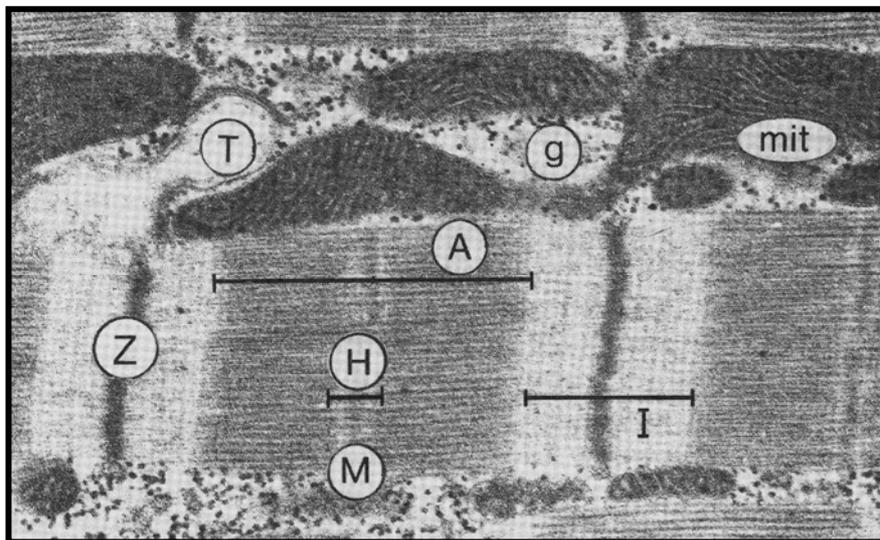


Figura 4. Miofibrillas y sarcómeros. Sección longitudinal obtenida de músculo papilar de rata. Se observan matrices regulares de miofibrillas, divididas en sarcómeros. Se aprecia la presencia de mitocondrias (mit), situadas entre las miofibrillas. También se observan gránulos de glucógeno (G) y túbulos T (T) que penetran en el músculo a la altura de las líneas Z (Z). Para descripción de las zonas A, H, I, M consultar el texto. (Tomado de Opie, 1998).

Por su parte, el filamento de actina se compone de un polímero de F-actina, tropomiosina y troponina (para revisión, Katz, 2001). Dos hebras de actina G se enrollan entre sí formando una espiral (la F-actina), donde también se dispone la tropomiosina. En los extremos de la tropomiosina se sitúa la troponina. Esta última es un complejo formado por tres subunidades proteicas, cada una con un papel específico. Así, la troponina I presenta gran afinidad por la actina e inhibe las interacciones entre ésta y la miosina. La troponina T es afín por la tropomiosina y la troponina C por los iones Ca^{2+} (aparentemente esa afinidad por el Ca^{2+} es lo que inicia la contracción).

Durante la contracción, los filamentos se deslizan el uno sobre el otro sin que las moléculas individuales de actina o miosina modifiquen su tamaño o se acorten. Con dicho desplazamiento, acercan las líneas Z entre si dando lugar al proceso contráctil. En general, el Ca^{2+} es quién desencadena el proceso y es también la molécula capaz de vincular la excitación de la membrana celular y el inicio de la contracción del músculo. Es decir, es quién controla el acoplamiento excitación contracción (E-C) (se detallará en próximos apartados).

Cuando hay un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), éste tiende a unirse a la subunidad troponina C produciendo profundos cambios conformacionales en ella. Debido a ello, los sitios activos del filamento de actina, antes bloqueados por la tropomiosina y la troponina, quedan libres. Tan pronto como sucede la activación del filamento de actina, las cabezas de los puentes cruzados del filamento de miosina son atraídas hacia los lugares activos del filamento de actina, induciendo la contracción. El proceso persiste hasta que se rompa la unión del Ca^{2+} con la troponina C, para lo que son necesarias altas concentraciones de magnesio. Si el Ca^{2+} no es eliminado completamente durante la diástole, la tensión se mantiene y el músculo puede desarrollar un incremento de la tensión de reposo e incluso, desencadenar contractura.

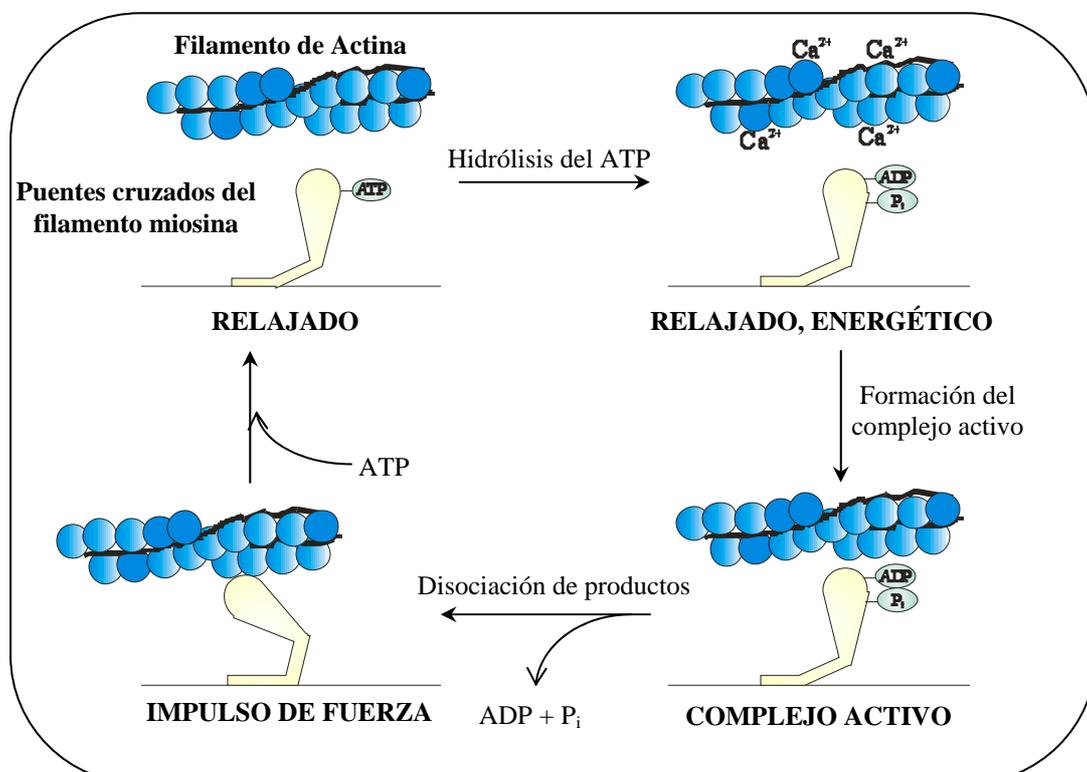


Figura 5. Interacción de los filamentos de actina y miosina para producir la contracción. (Modificado de Katz, 1992).

La contracción del músculo se puede explicar por la teoría de la “cremallera”. La cabeza de los puentes cruzados se une a un lugar activo del filamento de actina y a continuación se inclina hacia delante, desplazándolo (figura 5). Posteriormente, se desliga de ese sitio activo y se vuelve a unir a otro, y así sucesivamente durante el tiempo que dura el proceso de contracción. Por supuesto, este fenómeno se lleva a cabo con el consecuente gasto energético. A este respecto, se sabe que las cabezas de los puentes cruzados tienen propiedades ATPasas y por tanto, son capaces de desdoblar el ATP y emplear la energía derivada, del fosfato de alta energía (P_i) para su consumo, en el proceso de la contracción (figura 5).

➤ **El citoesqueleto**

Dentro del citoesqueleto se incluyen aquellas proteínas no contráctiles capaces de conectar los filamentos de actina y miosina a la membrana de la célula. El citoesqueleto también comprende las proteínas que conectan las sarcómeras entre ellas, las que unen las células a las estructuras extracelulares y el sistema microtubular (donde se encuentra la tubulina).

Detrás de los filamentos de actina y de miosina, el miocito contiene unos filamentos intermedios constituidos por diferentes proteínas, entre las que destaca la desmina. Ésta se organiza, tridimensionalmente, interconectando fibras transversales y longitudinales para formar unas bandas anilladas alrededor de las miofibrillas en las zonas próximas a la línea Z. De este modo, se consigue la conexión lateral entre las bandas Z.

La α -actitina se encarga de unir los filamentos de actina a su lugar de inserción en la banda Z.

La N-cadherina o molécula de adhesión celular une dos miocitos adyacentes a través del espacio extracelular.

La vinculina es una molécula elongada que posee lugares de unión para otras moléculas de vinculina y de α -actitina, que a su vez se unen a los filamentos de actina. Por tanto, la vinculina constituye una red vertebral que rodea el sarcolema y favorece la unión a las líneas Z. En procesos de isquemia, la vinculina desaparece lo que permite la ruptura fácil del sarcolema.

La integrina une el sistema contráctil y las líneas Z a la matriz de colágeno extracelular.

También destaca la titina, molécula muy larga y que gracias a sus propiedades elásticas posee un papel activo en las funciones mecánicas del corazón. Contribuye al estiramiento de los sarcómeros en la sístole y restaura la fuerza desarrollada en la diástole.

El citoesqueleto no es sólo un apoyo mecánico y estructural para la célula. Está involucrado en procesos fundamentales como la función contráctil, la adhesión celular, las interacciones entre células y la transferencia de información entre células y citosol. De hecho, hay estudios que afirman que la ruptura de los microtúbulos, en $\alpha\beta$ -tubulina modula la señalización intracelular de Ca^{2+} (Gómez y cols., 2000; Kerfant y cols., 2001).

➤ **Las Mitocondrias**

Las mitocondrias ocupan una gran proporción de cada miocito. Normalmente, se concentran en las partes de la célula que contribuyen activamente al metabolismo energético. Por ello, en los miocitos se encuentran encajadas entre las miofibrillas, presumiblemente, para suministrar rápidamente la energía.

La estructura básica de la mitocondria está compuesta por dos membranas, externa e interna, de bicapa lipídica/proteica. La membrana interna se encuentra plegada, formando *crestas*, donde están adheridas las enzimas oxidativas. Además, la cavidad interna de la mitocondria tiene una matriz que contiene grandes cantidades de enzimas disueltas, necesarias para extraer energía de los nutrientes. Estas enzimas operan asociadas a las enzimas oxidativas de las crestas para activar el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. Fenómenos, todos ellos, que tienen como resultado la obtención de energía en forma de ATP.

Además de la producción de energía, la mitocondria tiene la capacidad de acumular y liberar Ca^{2+} . Este proceso no parece estar relacionado con los movimientos de Ca^{2+} implicados en el acoplamiento E-C cardíaca, sino más bien, con un papel como reservorio del ion en situaciones de sobrecarga (por ejemplo, durante la ausencia severa de oxígeno) (Bers, 1991).

➤ El retículo sarcoplásmico (RS)

El RS es fundamental para la regulación de los movimientos de Ca^{2+} , ya que suministra Ca^{2+} en la contracción y lo recapta y lo almacena en la relajación.

El RS se extiende a través de todo el miocito y está delimitado por su membrana, una bicapa lipídica muy similar a la del sarcolema. Se compone de dos partes bien diferenciadas anatómica y fisiológicamente: las cisternas subsarcolémicas y el RS longitudinal (figura 6).

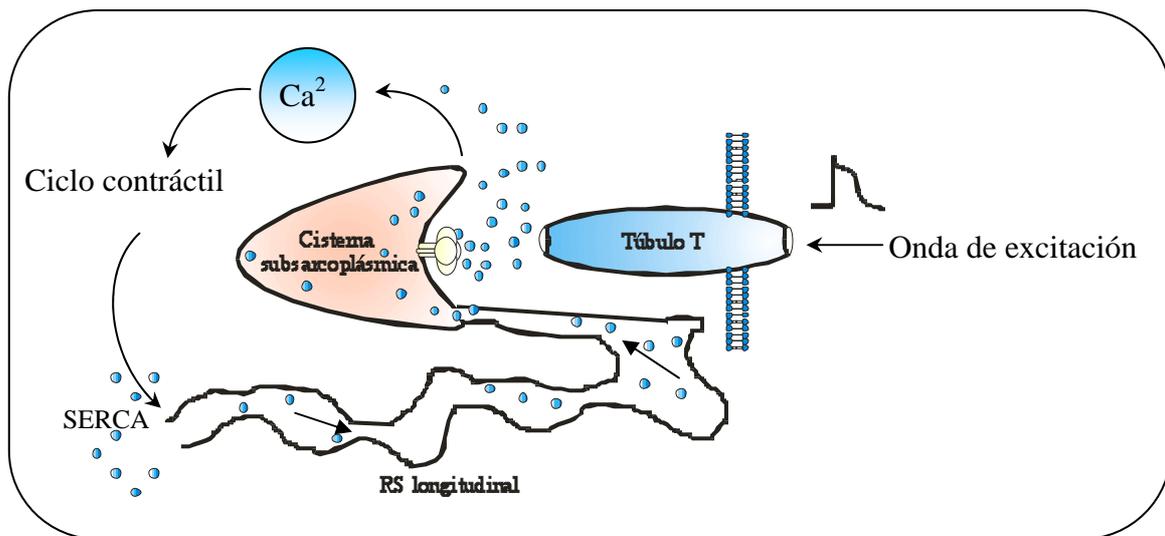


Figura 6. Representación esquemática de una diada. (Modificado de Opie, 1998).

Las **cisternas subsarcolémicas** (en inglés también se las denomina *junctional components*), se sitúan muy cerca de la superficie interna del sarcolema y más concretamente, envuelven y rodean a los túbulos T (figura 6). La combinación de una cisterna y de un túbulo-T forma una diada (figura 6) y el espacio comprendido entre ambos es la hendidura diádica. Sin embargo, el contacto entre la cisterna y el sarcolema puede llegar a ser más íntimo, debido a que de la cisterna emergen los canales de rianodina (RyR), también denominados los pies de las cisternas subsarcolémicas. La distancia que separa a los RyR de los túbulos T es muy pequeña (del orden de nm) y se denomina *fuzzy zone* (zona borrosa). Se cree que esta estructura facilita la comunicación entre los túbulos T y el RS. Por tanto, cuando la onda de despolarización llega al túbulo T, se abren los canales de Ca^{2+} tipo L situados allí, dejando que fluya el Ca^{2+} que deberá recorrer un corto espacio, para estimular la liberación de más Ca^{2+} , de los RyR (figuras 6 y 10) y, posteriormente, desencadenar la contracción.

El RyR, además de ser el canal por donde se libera el Ca^{2+} almacenado en el RS, es una proteína que sirve de soporte físico a otras proteínas reguladoras ubicadas, tanto en el exterior como en el interior del RS. Entre las moléculas situadas en el exterior, se incluyen la calmodulina y la FKBP 12.6. Esta última proporciona la unión funcional, que estabiliza la apertura o cierre individual de los RyRs y la de los tetrámeros adyacentes (Marx y cols., 2001). Otras proteínas como la proteína kinasa A (PKA), las fosfatasa 1 y 2A (Marx y cols., 2000) y la sorcina (proteína que une el RyR y el canal de Ca^{2+} tipo L) (Meyers y cols., 1998) también forman parte de este complejo. En el lumen de las cisternas subsarcolémicas (McLeod y cols., 1991), el RyR se acopla a proteínas como la triadina, junctina, calsecuestrina y calrectulina (Zhang y cols., 1997a) cuya función principal es la de tamponar el Ca^{2+} impidiendo su salida, hasta la siguiente despolarización.

Los RyRs se agrupan en matrices grandes y organizadas denominadas *cuplones* (del inglés *couplon*) que actúan de forma sincronizada. Cada canal es una estructura tetramérica cuya conductancia, 100 pS, es mucho mayor que la conductancia estimada para los canales de Ca^{2+} o Na^+ (10 pS). El subtipo más frecuente en el corazón es el RyR2, caracterizado por estar regulado mediante compuertas (Näbauer y cols., 1989) y por demostrar una dependencia al Ca^{2+} citosólico en forma de campana (Bezprozvanny y cols., 1991). Es decir, se activa a bajas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (del orden de nmoles/L) y se inhibe a altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (del orden de mmol/L).

Además de los RyRs, en el RS hay otros receptores específicos para el inositol trifostato (IP_3). Son receptores muy parecidos a los de RyRs pero de menor tamaño. Su actividad en el miocardio no es tan evidente como en el músculo liso vascular, donde es el encargado liberar el Ca^{2+} del RS. Sin embargo, podría cobrar importancia en situaciones patológicas graves, como en estados avanzados de insuficiencia cardíaca, donde se ha visto que la densidad del receptor de IP_3 está aumentada (Go y cols., 1995).

Por su parte, el **RS longitudinal** está compuesto por túbulos longitudinales ramificados y se le relaciona, principalmente, con la recogida del Ca^{2+} después de la contracción, iniciándose, de este modo, la relajación. Al comienzo de la diástole, la bomba de calcio dependiente de ATP del RS (SERCA, del inglés *SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) transfiere rápidamente grandes cantidades de Ca^{2+} al interior del RS. El Ca^{2+} recuperado por la bomba fluirá a lo largo de los túbulos

longitudinales hasta alcanzar las cisternas. Allí, otra vez será liberado durante la siguiente ola de despolarización.

➤ **El núcleo**

En general los miocitos cardíacos contienen uno, dos, o más núcleo. Se suele localizar en el centro de la célula y ocupa un 5% del volumen celular. Contiene casi toda la información genética requerida para el mantenimiento y la reparación de su estructura (el resto de la información está en las mitocondrias). Cada núcleo está rodeado por una envoltura con dos membranas de 10 nm de grosor, aproximadamente. Dicha membrana tiene poros selectivos que dejan fluir al interior ciertas sustancias necesarias para el funcionamiento normal del núcleo.

1.1.1.2. ESTRUCTURAS EXTERNAS

➤ **Sarcolema y glicocáliz**

La estructura básica del **sarcolema** es una bicapa lipídica formada por una fina película de lípidos, de tan sólo dos moléculas de espesor. Dispersas en ella, se encuentran las moléculas proteicas globulares que interrumpen la continuidad de la bicapa, constituyendo una vía alternativa de paso a través de la membrana celular (figura 7).

La bicapa lipídica se compone de fosfolípidos (siendo el componente de la membrana que mayor resistencia ofrece al paso de la corriente) y de colesterol. Ambas moléculas poseen, en su estructura, una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. Así, el fosfato de los fosfolípidos es hidrofílico, mientras que el ácido graso es hidrofóbico. Por su parte, el radical hidroxilo del colesterol es hidrofílico, pero el núcleo esteroídico tiene carácter hidrofóbico.

Las porciones hidrófobas se atraen mutuamente y, por tanto, se orientan con las porciones lipofílicas ocupando el centro de la membrana. Las porciones hidrofílicas se proyectan hacia las dos superficies, quedando en contacto con las soluciones electrolíticas (figura 7).

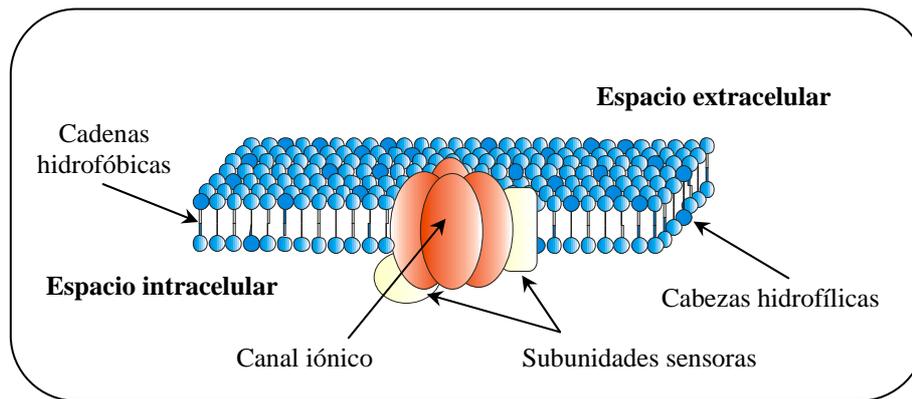


Figura 7. Esquema básico de la estructura de la membrana celular.
(Modificado de Jalife y cols., 1999).

La zona hidrofóbica de la bicapa tiene un espesor de 50 Å. Su constante dieléctrica varía entre los valores de 4 a 5, lo que le hace ser un buen aislante. Esto unido a su espesor, le confiere la propiedad de actuar como un buen capacitor y los iones no pasan fácilmente a su través.

Distribuido a lo largo del sarcolema y separando a éste del espacio extracelular, se encuentra una zona crepuscular, el **glicocáliz**, cuya función principal es ayudar a regular la entrada del Ca^{2+} en los miocitos. Por tanto, el glicocáliz es la capa más externa de la célula y está compuesta fundamentalmente por polisacáridos asociados a proteínas (formando glicoproteínas). Normalmente, las proteínas están cargadas negativamente y atrapan el Ca^{2+} . Experimentalmente, se puede eliminar el glicocáliz por supresión y reincorporación del Ca^{2+} extracelular (paradoja del Ca^{2+}). Su pérdida tiene efectos letales para la célula ya que el Ca^{2+} entra libremente al citosol.

Por tanto, la principal función atribuida al sarcolema y al glicocáliz es la de regular con precisión la concentración iónica a ambos lados de la membrana. La concentración extracelular de este ion es, aproximadamente, 1000 veces mayor que la concentración de Ca^{2+} intracelular (Tabla 1). Por ello, el sarcolema debe ser impermeable para ellos, permitiendo el paso de trazas de Ca^{2+} para desencadenar los procesos intracelulares relacionados con la contracción.

Además, el sarcolema consta de unas proteínas que se unen a las colas de la membrana por sus cadenas laterales de aminoácidos y que colaboran en el mantenimiento de la composición iónica a cada lado de la membrana. Estas proteínas actúan, bien como bombas, como intercambiadores o como canales.

➤ **Sistema tubular transverso (túbulos T)**

El sarcolema no es una membrana uniforme y lisa, al contrario, sufre invaginaciones formando unos pequeños pasillos o túbulos, denominados túbulos T. Este sistema hace posible el contacto cercano entre los dominios celulares del exterior y del interior, además de ampliar la superficie celular por lo menos en un 30 %. De este modo, se facilita la dispersión del estímulo excitatorio por toda la célula. El lumen de los túbulos T es lo suficientemente amplio como para asegurar el suministro adecuado de nutrientes y de oxígeno. Aun así, el fluido que baña los túbulos T no es exactamente igual que el del espacio extracelular ya que el acceso no es completamente libre.

En los túbulos T se sitúan los canales de Ca^{2+} tipo L que se activan cuando llega la excitación eléctrica, permitiendo la entrada de Ca^{2+} para la posterior activación de los RyR del RS.

➤ **Canales iónicos**

A pesar de su pequeño tamaño, los iones (transportadores de carga en el proceso de excitación eléctrica) no atraviesan fácilmente la bicapa lipídica y por ello, deben pasar a través de los canales proteicos. Parece ser que su carga hace que se unan con moléculas de agua, dando lugar a iones hidratados de mayor tamaño, incapaces de atravesar la barrera lipídica. Aunque también es posible, que dada su carga eléctrica, interaccionen con las cargas de las zonas polares de la membrana, lo que evitaría su entrada al citosol. Es por ello, que en la membrana hay unas estructuras proteicas especializadas, en forma de tubo, por donde los iones que le son necesarios a la célula pasan con toda facilidad.

Los canales iónicos son macromoléculas proteicas que abarcan el grosor entero de la membrana, conformando en su interior la estructura que permite o facilita el movimiento de iones a través de la barrera hidrofóbica (figura 7).

Un ion que se sitúa en el exterior de la célula se encuentra a su paso por el canal, un vestíbulo exterior, un filtro estrecho selectivo, otro vestíbulo interior voluminoso, una compuerta que cierra el poro y unas subunidades sensoras.

Los canales iónicos poseen varias propiedades fundamentales. En primer lugar, los iones interaccionan con el canal en diversos puntos, pero nunca forman enlaces

covalentes. Puede ser que más de un ion esté dentro del canal simultáneamente, pero el tiempo que un ion permanece parado en el canal es más corto que el tiempo de la llegada de nuevos iones para pasar a su través.

Otra característica importante es que los canales son permeables de forma selectiva para determinados iones y su conductancia para ellos es siempre la misma. Así, se puede hablar de canales selectivos para Na^+ , K^+ , o Ca^{2+} , entre otros. Esta propiedad depende tanto de la forma y del tamaño del ion, como de las cargas eléctricas que se encuentren distribuidas por el canal. Sin embargo, la selectividad no es perfecta y aquellos iones con mayor permeabilidad y conductancia no tienen porque ser los iones que el canal transporta fisiológicamente. Por ejemplo, el bario atraviesa más fácilmente el canal de Ca^{2+} que el propio Ca^{2+} .

Por último, la característica más importante de un canal iónico es su capacidad de apertura o cierre, también conocido como sistema de compuertas (*gating*, en inglés). Las compuertas constituyen un medio de control de la permeabilidad de los canales. Son extensiones de las moléculas proteicas, capaces de abrir o cerrar el canal por medio de variaciones conformacionales. En condiciones normales los canales están cerrados y se abren o activan en respuesta a una señal específica.

Si la señal es una despolarización o una modificación en el potencial, se habla de canales activados por voltaje. En este caso la conformación molecular de las compuertas responde al potencial eléctrico. Esta familia de canales incluye los canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , y consiste en el paso de iones como respuesta a un gradiente electroquímico.

En otros casos, la activación de un determinado canal depende de ligandos extracelulares o intracelulares que interactúan con dominios específicos de la molécula que forma el canal. Ello induce un cambio de conformación del canal que resulta en la apertura o el cierre del mismo. De entre estos canales dependientes de ligando, se pueden citar algunas corrientes rectificadoras de entrada de K^+ que dependen de la acetil-colina (ACh), y del ATP ($I_{\text{K(ACh)}}$ y $I_{\text{K(ATP)}}$, respectivamente).

El fenómeno de *gating* o sistema de compuertas se puede explicar como un cambio conformacional de las proteínas que constituyen la estructura interna del canal. Circunstancia que previene o permite el paso del ion. Para simplificar, se suele explicar este fenómeno mediante la teoría postulada por Hodgkin y Huxely, en 1952, cuando estudiaban las bases iónicas del potencial de acción (PA) del axon del calamar gigante.

Su hipótesis proponía tres estados distintos para el canal: cerrado o inactivo, abierto o activo y en reposo (figura 8). Así, cuando un canal está cerrado en reposo no deja pasar iones a su través, pero es susceptible de ser activado por un estímulo adecuado, entonces cambiará su conformación al estado abierto. Posteriormente, el canal se inactivará (estado cerrado) y no dejará que pase corriente a través de él durante un período de tiempo (período refractario), después del cual, volverá al estado de reposo y será de nuevo susceptible de activación (figura 8). La respuesta más lenta, por parte del canal, al voltaje, es del estado cerrado al estado de reposo. Una vez en este estado, puede variar muchas veces de no conductor a conductor etc.

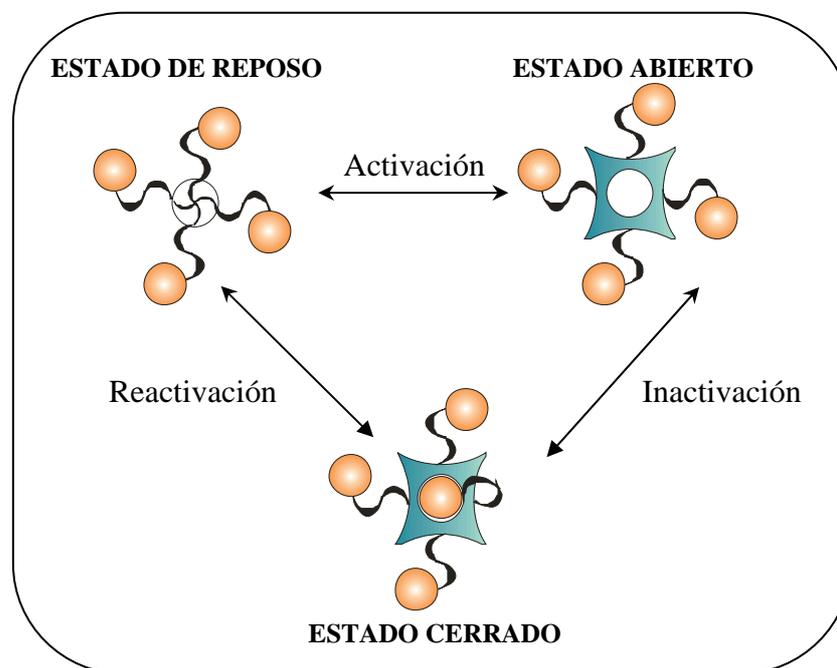


Figura 8. Representación esquemática de los posibles estados en que se puede encontrar un canal. (Modificado de Armstrong y Hille, 1998).

La inactivación, puede deberse a distintos procesos según el tipo de canal. En los canales dependientes de receptores, la inactivación se provoca tras la exposición prolongada del receptor al ligando. El proceso se llama desensibilización y se debe a propiedades intrínsecas del canal o a procesos de fosforilación. En los canales dependientes de voltaje, el estado refractario o inactivación se relaciona con cambios conformacionales controlados por una subunidad o región del canal distinta de la que controla el proceso de activación (como en el caso del canal de Na^+ y K^+) o con modificaciones causadas tras el paso del ion (como en el caso del Ca^{2+} que se fija al canal y ocasiona la desfosforilación de las proteínas).

Además de los estados de transición básicos (figura 8), mencionados anteriormente, el canal puede sufrir transiciones a estados intermedios. Por tanto, un canal puede tener uno o varios estados inactivos o cerrados y producirse diversas formas de transiciones entre ellos antes de llegar de nuevo a abrirse. A este fenómeno se le denomina *parpadeo u oscilación* (viene del inglés *flickering*) y se interpreta como si dentro de un mismo estado existieran oscilaciones rápidas al resto de los estados del canal (Armstrong y Hille, 1998).

Por otro lado, algunos canales muestran propiedades de *ráfagas* (del inglés, *Bursting*). Ello induce la apertura y cierre rápido del canal.

➤ **Tejido conectivo cardíaco**

El tejido conectivo cardíaco o matriz extracelular es muy importante pues actúa como soporte mecánico de las células contráctiles. Normalmente, se dispone alrededor de los componentes celulares del corazón y los une unos con otros (este trabajo puede ser vital en funciones metabólicas). Los fibroblastos son los encargados de producir la matriz extracelular. El componente principal es el colágeno, sustancia determinante en la rigidez del tejido miocárdico. De hecho, un acúmulo del mismo incrementa de forma anormal la rigidez y puede llegar a alterar la función cardíaca.

El colágeno (de tipo I y III en el corazón) se organiza en fibras que están presentes en el espacio extracelular y rodean a los miocitos cardíacos. Estas fibras actúan como puntales para mantener las miofibrillas en la posición adecuada durante la contracción. Probablemente, la matriz de colágeno limita la dilatación del corazón en estados patológicos.

Otro componente del tejido conectivo son las fibras elásticas, compuestas por elastina. Se localizan próximas al colágeno y como su propio nombre indica, otorgan propiedades elásticas al miocardio.

Los fibroblastos cardíacos producen, además del colágeno, la fibronectina (glicoproteína que influencia las propiedades celulares, incluyendo el crecimiento y la reparación hormonal) y la laminina.

Como en casi todos los sistemas del organismo, existe un equilibrio entre la producción y la degradación de las sustancias. Así, en este caso, quienes regulan la síntesis de colágeno, y del resto de los componentes de la matriz extracelular son la

angiotensina II, la aldosterona y ciertos factores de crecimiento. Por el contrario, son las enzimas metaloproteínas de matriz, las encargadas de degradarlos.

➤ **Comunicación entre cardiomiocitos**

Cuando las células establecen contacto físico unas con otras, el sarcolemma se especializa dando lugar a los **discos intercalares**. Dichos discos constan de tres áreas especializadas, donde se insertan los filamentos de actina: la fascia adherente, los desmosomas y el nexo (donde se sitúan los canales iónicos). Todas estas estructuras permiten la continuidad mecánica entre los miocitos cardíacos.

La comunicación eléctrica se hace a través de unos canales específicos o *gap junctions* que atraviesan los discos intercalares. A través de estos canales se transportan pequeñas moléculas e iones de una célula a otra. Las **conexinas** son las proteínas específicas que forman el canal. Gracias a este sistema, donde las células están tan estrechamente unidas, cuando una célula es excitada, el PA difunde a todas, pasando de célula a célula lateralmente, a través de las interconexiones en forma de red. Se dice, por tanto, que el músculo cardíaco es un sincitio (del latín, *syn*, junto y *cito*, célula) que tiene la capacidad de hacer funcionar a multitud de células de forma similar y al mismo tiempo.

1.2. FISIOLÓGÍA DE LOS MIOCITOS CARDÍACOS

1.2.1. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO

Cuando las células ventriculares cardíacas se encuentran en reposo, mantienen un potencial de membrana que oscila entre -80 y -90 mV. El ion encargado de mantener dicho potencial de reposo es el K^+ , ya que la membrana es más permeable para él que para el resto de iones. Así, el potasio fluye al exterior o al interior de la célula compensando las cargas a un lado y a otro de la membrana, de tal forma que la diferencia de potencial sea siempre, prácticamente, la misma. Este gradiente de concentraciones se mantiene gracias a la actividad de distintas bombas, principalmente la bomba Na^+/K^+ y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} , presentes en la membrana cardíaca. Los iones de Na^+ tenderán a penetrar al interior celular mientras que los iones de K^+

tenderán a salir, siguiendo su gradiente de concentraciones. A niveles negativos de potencial de membrana (potencial de reposo normal de la célula cardíaca), los canales de Na^+ están cerrados y no permiten el paso de Na^+ al interior celular. La bomba Na^+/K^+ está activa, de manera que saca Na^+ fuera de la célula a favor de la entrada de K^+ , contra gradiente de concentración, en razón 3:2, respectivamente. Además, existe un canal de K^+ cuya activación genera una corriente de salida de K^+ , I_{K1} que a potenciales negativos permanece en estado abierto y es capaz de sacar iones K^+ al exterior celular. Como consecuencia, el interior celular es un medio rico en K^+ y bajo en Na^+ , todo lo contrario que el exterior.

Durante la excitación eléctrica, las células son capaces de variar su potencial de membrana, lo que desencadena el PA (figura 9). La onda eléctrica que llega a los miocitos, varía por unos instantes (de 100 ms a 200 ms, dependiendo de la especie) las propiedades de la membrana. Como consecuencia, se activan canales iónicos que dejan pasar iones como el Na^+ y el Ca^{2+} , que en condiciones de reposo eran impermeables. Por tanto, se podría decir que el PA se construye a partir de la activación de diferentes corrientes iónicas, que se encuentran inactivadas cuando la célula está en reposo, pero que se activan cuando una excitación eléctrica varía el potencial de la célula.

El PA consta de cuatro fases, dos fases donde el potencial de membrana se despolariza (se hace más positivo), porque se activan corrientes de entrada, de sodio y de Ca^{2+} . Las otras dos fases tienden a restablecer el potencial de reposo son, por tanto, corrientes repolarizantes (el potencial de membrana se hace más negativo) porque se activan corrientes de salida de potasio hiperpolarizantes.

Fase 0. Disparo del potencial de acción

Como se mencionó previamente, los canales de potasio son los encargados de mantener el potencial de membrana. Sin embargo, una vez que se alcanza un umbral, de aproximadamente -65 mV, los canales de sodio se abren rápidamente. Por tanto, en el potencial umbral, la membrana varía su preferencia por el potasio y se hace mucho más permeable para el sodio. Durante un breve espacio de tiempo, pero de forma muy rápida y eficaz, entra mucho sodio al interior de la célula. Así, la membrana se hace menos negativa (se despolariza), y alcanza valores aproximados de $+40$ mV (la fase del potencial de membrana que supera los 0 mV se denomina *overshoot*), induciendo el disparo del PA. Sin embargo, el aumento de la conductancia de sodio es muy breve y

después de unos milisegundos los canales de sodio se inactivan y comienza la repolarización.

Fase 1. Fase de repolarización temprana

El final de la fase 0 se alcanza cuando, de forma concomitante, se inactivan los canales de sodio y se activan los canales de potasio. En esta fase, ocurre una repolarización rápida llevada a cabo por la corriente transitoria de potasio (I_{to}). La duración y el tamaño de la fase 1 de repolarización, varían según las especies y según la zona anatómica del corazón. Ésta última, está directamente relacionada con la magnitud de la I_{to} en cada caso. Así, los potenciales de acción de las células de la zona apical y de las células de Purkinje presentan una fase 1 más prominente que aquellos registrados en la zona del septum. De hecho, un estudio reciente corrobora la heterogenidad eléctrica de las células del ventrículo de perro (Antzelevitch y Fish, 2001).

Fase 2. Fase de meseta (*plateau*)

La fase 2 es una etapa repolarizadora más lenta que la anterior ya que la corriente de Ca^{2+} (I_{CaL}) previene la repolarización llevada a cabo por las corrientes de potasio. Por tanto, estarán fluyendo, a la vez, corrientes de signo opuesto que inducirán menores variaciones en el potencial de membrana, dando lugar a una meseta. La corriente repolarizante, mayormente implicada, es la corriente de rectificación de potasio (I_K), tanto el componente rápido (I_{Kr}) como su componente lento (I_{Ks}). La I_{to} también contribuye en la fase temprana de la meseta, en aquellas células cuya amplitud sea considerable. La corriente despolarizante que predomina en esta fase es la I_{CaL} , aunque también se ha descrito una pequeña contribución de una fracción de la corriente de sodio (I_{Na}) que se inactiva lentamente. Por tanto, la duración de esta fase de repolarización y las variaciones en el potencial de membrana dependen del equilibrio entre las corrientes de entrada y las de salida. En algunas células, como las de Purkinje, las corrientes de salida (repolarizantes) predominan, por lo que la fase de meseta presenta una pendiente negativa.

Fase 3. Fase de repolarización

La inactivación de los canales de Ca^{2+} conlleva el final de la fase de meseta. Así, sólo las corrientes repolarizadoras continúan activadas y por ello, la restauración del potencial de membrana será rápida, gracias a los canales de potasio que todavía

permanecen abiertos. Cuando el potencial se hace más negativo, la corriente I_K se inactiva y es entonces la corriente de rectificación de entrada (I_{K1}) la que predomina.

Fase 4. Fase de regreso al potencial diastólico (lenta despolarización diastólica)

En las células no automáticas el potencial de reposo permanece constante durante el período de diástole. En este tipo de células, la I_{K1} es la corriente que predomina durante el reposo y de hecho, es la responsable del mantenimiento del mismo. Hay otras corrientes de fondo que también intervienen y lo elevan a valores más positivos del valor estimado para la corriente de potasio en equilibrio. De este modo, las células no automáticas conservan un valor más o menos estable de potencial, hasta que un nuevo estímulo eléctrico lo varía, haciéndolo llegar hasta el umbral que desencadenará un nuevo PA.

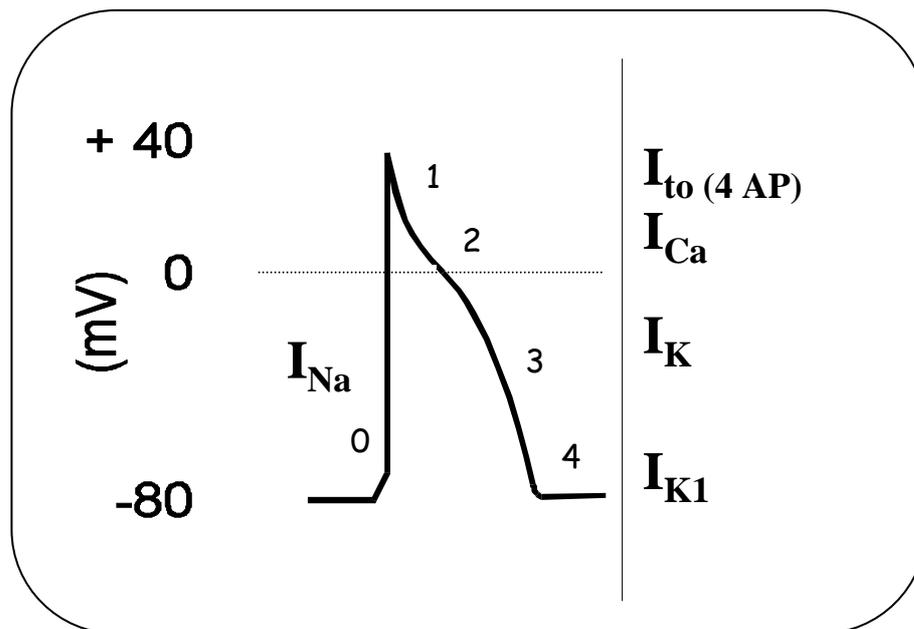


Figura 9. Esquema de un PA cardíaco y de las corrientes implicadas en cada fase del mismo.

En las células marcapasos (células presentes en el nodo sinoauricular y aurículoventricular), con actividad espontánea, el potencial de membrana en la fase 4 no permanece constante. Al contrario, lo que sucede es que una lenta despolarización espontánea lleva a la membrana desde el potencial más negativo, alcanzado al final de la repolarización, hasta el potencial umbral de disparo. Es importante destacar que el

potencial de reposo de estas células oscila entre -50 mV y -60 mV, es por tanto, menos negativo que el valor de potencial en las células auriculares o ventriculares. En este tipo de células, el potasio no es tan permeable, lo que explica que la repolarización se vea limitada a potenciales despolarizados y es la I_{CaL} quién dispara el PA, lo que explica, a su vez, que el disparo sea más lento. Con respecto al mecanismo iónico implicado en la fase de lenta despolarización diastólica, parece que se activan diversas corrientes de entrada, como la I_{CaL} y la corriente activada en la hiperpolarización (I_f), y se inactivan a su vez, los canales de potasio.

Período refractario

Se llama período refractario al intervalo de tiempo durante el cual no se puede establecer un segundo PA, sea cual sea la magnitud del estímulo. Esta característica la cumplen todas las células excitables, aunque la duración del mismo en las células cardíacas es más largo en comparación con otras células excitables tales como neuronas, y células del músculo esquelético. Esta propiedad tiene la ventaja funcional de que los miocitos cardíacos nunca pueden alcanzar estados de contracción tetánica, que de llegar a producirse, tendrían consecuencias fatales en el corazón. Parece ser que el estado de los canales tiene algo que ver en el período refractario, ya que transcurre un tiempo desde que se inactivan hasta que pasan al estado de reposo, donde pueden activarse de nuevo.

1.2.2. CORRIENTES IÓNICAS IMPLICADAS EN EL PA

Durante el PA se producen intensas variaciones de voltaje. Al principio el voltaje se hace positivo, lo que implica la despolarización de la célula y después hay un retorno al potencial de membrana. Es decir, que el voltaje se vuelve, otra vez, negativo y por tanto, la célula se repolariza. Todas estas variaciones en el voltaje son consecuencia de la activación de varias corrientes iónicas. Así, durante fase ascendente y de meseta del PA, predominan las corrientes de entrada, despolarizantes (de sodio y Ca^{2+} , respectivamente), mientras que la fase descendente está protagonizada por corrientes de salida, repolarizadoras (normalmente, de potasio). El equilibrio entre las corrientes de entrada y las de salida es lo que define la duración del PA.

1.2.2.1. CORRIENTE DE Na^+ (I_{Na})

La I_{Na} es la corriente encargada de excitar a casi todas las células cardíacas de la aurícula, el ventrículo, y las fibras de Purkinje. No parece que esté implicada en el PA del nodo sinoauricular y del nodo aurículoventricular. En estas zonas los canales de Na^+ , si los hay, están inactivados pues los potenciales de membrana de estas células son menos negativos (-60 mV) que los de las células ventriculares, auriculares o de Purkinje (-75, -90 mV).

Se trata de una corriente despolarizante, de entrada, cuyo canal permanece cerrado durante el potencial de reposo. Se activa durante la fase 0 del PA cuando la membrana alcanza el potencial umbral. Durante un período muy corto de tiempo, pero de forma muy rápida, fluyen iones Na^+ al interior de la célula, lo que implica la despolarización de la membrana hasta alcanzar potenciales positivos. A su vez, se desencadena la inactivación rápida del canal y la activación de otros canales de K^+ y Ca^{2+} . Así, se podría decir que la I_{Na} es una corriente muy transiente, propiedad muy importante para la conducción rápida del impulso eléctrico en el miocardio.

Una vez desencadenado el PA, es la bomba Na^+/K^+ la encargada de restablecer el gradiente de Na^+ en el interior celular.

El canal de Na^+ está regulado por diversos neurotransmisores (NTs). Por ejemplo, la noradrenalina (NA) modifica la inactivación por activación de la PKA y posterior fosforilación del canal. Por su parte, la proteína quinasa C (PKC), también fosforila el canal pero en este caso, enlentece la inactivación del canal y reduce la amplitud de la corriente. Asimismo, el canal se bloquea con el cadmio, el zinc y la tetrodotoxina (TTX).

1.2.2.2. CORRIENTES DE Ca^{2+} (I_{CaL} e I_{CaT})

Otra de las corrientes repolarizadoras tienen al Ca^{2+} como transportador de carga. Hay dos tipos de canales por donde el ion puede fluir, el canal de Ca^{2+} tipo L (del inglés, *Long lasting*, larga duración) y el canal de Ca^{2+} tipo T (*Transient current*, corriente transiente y *Tiny conductance*, conductancia minúscula).

El **canal de Ca^{2+} tipo T**, es un canal de bajo umbral, cinética rápida y conductancia pequeña. Se activa e inactiva a potenciales de membrana cercanos al

potencial de reposo. Su inactivación es muy rápida. Se caracteriza por ser relativamente insensible a las dihidropiridinas o al cadmio, aunque se bloquea con el níquel.

La aparición de este canal en células nodales (Hagiwara y cols., 1988) y en células cardíacas embrionarias (Wetzel y cols., 1993) hace pensar que está involucrado en la generación del potencial marcapasos.

Por otro lado, esta corriente aparece sobre todo en estadios fetales y desaparece posteriormente. Sin embargo, aparece en situaciones donde se vuelven a expresar patrones fetales, como la hipertrofia (Martínez y cols., 1999), aunque su posible implicación fisiológica o patológica todavía se desconoce.

La I_{CaL} o corriente de alto umbral (será objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral), requiere una despolarización significativa del potencial de membrana para su activación y su inactivación es lenta. Bajo condiciones similares, la conductancia del canal de Ca^{2+} tipo L es dos veces mayor que la conductancia del canal de Ca^{2+} tipo T. En comparación con la I_{Na} , la I_{CaL} se activa a potenciales de membrana más despolarizados y sus propiedades de activación son más lentas.

Esta corriente depende del tiempo y del voltaje. La curva que representa la corriente en función del voltaje tiene forma de "V". Su umbral de activación es de -35 mV, alcanzando un pico de máxima corriente alrededor de 0 mV. El potencial de reversión está cercano a los 60 mV. El pico de activación se alcanza en un tiempo inferior a 10 ms. La cinética de esta última puede ser biexponencial con una constante de inactivación rápida de alrededor de 10 ms y otra lenta de 50 ms, aproximadamente. En células humanas estos parámetros son similares a los anteriores (Bénitah y cols., 1992). La reactivación también es lenta, de 30 a 300 ms.

La activación en estado estacionario de esta corriente presenta una forma sigmoïdal, con un umbral de activación de -40 a -20 mV y una pendiente del orden de 7 . La inactivación en el estado estacionario tiene una forma sigmoïdal, que va desde -50 mV a $+10$ mV, con un potencial de semiinactivación entre -20 y -30 mV y una pendiente entre 0 y -11 . Sin embargo, esta inactivación no es completa para potenciales mayores de $+20$ mV. Esto se puede deber a la superposición de las curvas de activación e inactivación en estado estacionario, también llamado corriente ventana. De hecho, existen dos mecanismos de inactivación de estos canales de Ca^{2+} : uno dependiente del potencial y otro dependiente del mismo ion Ca^{2+} (McDonald y cols., 1986). Esto se ha

demostrado porque el uso de Ba^{2+} o Na^+ como transportadores de carga hacen desaparecer la fase rápida de inactivación, inducida por el Ca^{2+} (Bers y Pérez-Reyes, 1999). También se ha pensado que la calmodulina puede unirse al canal y mediar la inactivación dependiente de Ca^{2+} (Peterson y cols., 1999; Qin y cols., 1999). Asimismo, se ha apuntado la influencia del Ca^{2+} liberado del RS sobre esta fase de la inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} (Adachi-Akahane y cols., 1996; Scriven y cols., 2000).

El potencial de reversión (60-70 mV) es inferior al esperado según el potencial de equilibrio calculado por la ecuación de Nerst (130 mV), esto indica que estos canales además del Ca^{2+} dejan pasar otros iones, aunque en menor proporción, como el potasio y el sodio (Lee y Tsien, 1982; Hess y Tsien, 1984). El canal inactivado por la despolarización de la membrana, puede volver a un estado disponible en la repolarización. El proceso de reactivación se ha descrito de forma monexponencial, biexponencial y oscilatorio. En este proceso se induce un aumento transitorio de la I_{CaL} por encima del valor control. Este fenómeno depende del potencial y posiblemente de la concentración intracelular de Ca^{2+} .

El canal se caracteriza por ser una proteína multimérica constituida por una subunidad que forma el poro y que proporciona al canal sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Esta subunidad (subunidad $\alpha 1c$) está asociada a subunidades transmembranales (subunidad $\alpha 2-\delta$) y a subunidades citoplasmáticas reguladoras (subunidad β) (Catterall, 2000). De manera similar a la I_{Na} , los análisis de activación de la I_{CaL} muestran que el comportamiento del canal puede ser modelado, usando un diagrama de estado que incluye dos estados cerrados y uno abierto, siendo cada paso dependiente de voltaje.

Los canales de Ca^{2+} son selectivos para ciertos iones divalentes, como el Ba^{2+} y el Sr^{2+} , y son bloqueados por Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , La^{2+} , o fármacos antagonistas del Ca^{2+} (verapamil). Se ha demostrado, también, que estos canales son sensibles a los agonistas β (inducen un aumento en esta corriente en células adultas). Sin embargo, en células embrionarias no hay respuesta del canal a la estimulación β -adrenérgica. Circunstancia que explicaría la desaparición de dicha respuesta en situaciones patológicas (por ejemplo, en la hipertrofia y en la insuficiencia cardíaca) donde se vuelven a expresar genes fetales (Maltsev y cols., 1999; Swynghedauw, 1999). No obstante, en dichas

patologías, a veces, aparece una respuesta β residual que incrementa considerablemente el riesgo de arritmias (Pogwizd y cols., 2001).

La I_{CaL} proporciona una corriente de entrada sostenida que produce una despolarización larga, responsable de la meseta del PA. Además, acopla el fenómeno de excitación con el de contracción. En las células marcapasos es importante porque dispara el PA.

1.2.2.3. CORRIENTES DE K^+

Los canales de potasio proporcionan corrientes de salida que dan lugar a la repolarización celular. Actúan en la fase 1 del PA o fase de repolarización temprana, en la fase 3 y en la fase de mantenimiento del potencial de reposo. Se han descrito numerosos canales de potasio selectivos en preparaciones de miocitos, ya sean maduros e inmaduros (Carmeliet, 1989). Entre estos diferentes tipos destacamos los siguientes grupos (para revisión Nerbonne, 2000).

I_{to} : Corriente transitoria de salida de potasio (será objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral). Su amplitud depende del potencial de membrana y es la responsable de la fase 1 del PA. La amplitud de esta corriente también depende de la frecuencia de estimulación (la amplitud es menor a altas frecuencias de estimulación, lo que induce la prolongación del PA). La densidad de su canal difiere según la localización de la célula en el músculo cardíaco, la especie y la edad (Escande y cols., 1985; Antzelevitch y Fish, 2001).

Se activa rápidamente con la despolarización y es verdaderamente activa a potenciales muy despolarizados. El umbral para su activación es aproximadamente -30 mV. La I_{to} tiene una naturaleza transiente. Su rápida activación es seguida por la inactivación durante la meseta del PA. A causa de su dependencia del voltaje y de su curso temporal, la I_{to} se solapa y opone a la I_{CaL} .

Se ha descrito que la I_{to} está compuesta, al menos, por dos corrientes distintas (I_{to1} e I_{to2}), que pasan a través de dos canales físicamente diferentes (Tseng y Hoffman, 1989). La I_{to1} es una corriente de K^+ , independiente de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) y es sensible a la 4 aminopiridina (4-AP). Este componente es muy

similar a la corriente I_A de las fibras nerviosas. El segundo componente de I_{to} (I_{to2}) es dependiente de Ca^{2+} y menos sensible a 4-AP, pero más sensible a otro bloqueante de K^+ , el cloruro de tetraetilamonio (TEA). Hoy en día está clara la naturaleza iónica de este canal, pues existen evidencias de que pueda ser un canal selectivo para el Cl^- (Zygmunt y Gibbons, 1991; Zygmunt, 1994), por ello no se hablará más profundamente de él.

Al componente independiente de Ca^{2+} , denominado I_{to1} , se le denominará I_{to} a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Dicho componente parece ser el responsable de la mayor parte de la repolarización que tiene lugar en la fase 1 del PA. Actualmente, se ha demostrado que existen, al menos, dos tipos de I_{to} (distribuidos diferencialmente). La corriente que se inactiva muy rápidamente es conocida como la $I_{to, fast}$ o $I_{to,f}$ y a la que se inactiva más lentamente se la ha llamado $I_{to, slow}$ o $I_{to,s}$ (Xu y cols., 1999). Ambos componentes se encuentran en miocitos ventriculares de varias especies incluyendo la rata y el hombre (Apkon y Nerbonne, 1991; Näbauer y Kääb, 1998) y no aparece en los miocitos de cobayo (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991). Algunas especies sólo presentan un componente, como es el caso del conejo, cuya I_{to} es similar al componente de lenta inactivación, $I_{to,s}$.

En la presente Tesis Doctoral se estudió la corriente I_{to} sensible a 4-AP ($I_{to(4-AP)}$) que incluye los dos componentes de la I_{to} ($I_{to,fast}$ e $I_{to,slow}$), pero que excluye todas las corrientes de potasio no sensibles a este bloqueante.

La $I_{to(4-AP)}$ se activa a potenciales cercanos a -30 mV. La activación es muy rápida, de 2 a 10 ms, con los valores menores a potenciales más despolarizados. La inactivación es algo más lenta, y sigue un curso monoexponencial con una constante de tiempo de 20 a 50 ms. La curva que representa la corriente en función del voltaje tiene forma lineal, aumentando progresivamente con la despolarización. La activación y la inactivación en estado estacionario tienen forma sigmoidal, siendo muy variables los potenciales encontrados que definen sus curvas.

I_K : Corriente de rectificación retardada de potasio. Es la corriente repolarizadora más importante (implicada en la fase 3 de repolarización del PA) en la mayoría de las preparaciones ventriculares, incluyendo la rata y el hombre (Apkon y Nerbonne, 1991; Li y cols., 1996). También parece estar implicada en el inicio de la despolarización de la

membrana en las células automáticas. La I_K se activa lentamente (cuando el potencial se hace más positivo de -40 mV) comparada con la mayoría de las otras corrientes y no se inactiva con el tiempo. Por tanto, la I_K aumenta gradualmente durante la despolarización sostenida cuando los voltajes oscilan a nivel de la meseta del PA. Se distingue perfectamente de la I_{to} por su lenta activación, porque carece de inactivación o ésta es parcial y por su diferente selectividad farmacológica.

Actualmente, se ha aceptado la existencia de diversos subtipos de canales de esta corriente con diferente conductancia, el I_{Kr} ($I_{K,rapid}$), y el I_{Ks} ($I_{K,slow}$) (descritos primeramente por Noble y Tsien a finales de la década de los 60). En general, se diferencian por sus propiedades biofísicas, farmacológicas y reguladoras (Lindblad y cols., 1996). Dado el amplio número de subtipos definidos, se podría simplificar que en la rata se han descrito el subtipo I_{Kr} y el I_{ss} , presentes en el ventrículo y la aurícula. También se ha encontrado el subtipo I_{Kur} y el $I_{K,DTX}$, presentes en la aurícula, y el subtipo I_K localizado en el ventrículo. En el hombre también se encuentran la I_{Kr} y I_{Ks} presentes tanto en la aurícula como en el ventrículo, la I_{Kur} y la $I_{K,slow}$ predominantes en la aurícula y la I_{ss} situada en el ventrículo (para revisión Nerbonne 2000).

Los agonistas β -adrenérgicos pueden estimular la I_K , de igual forma que lo hacen sobre la I_{CaL} . Por tanto, la estimulación adrenérgica tenderá a acortar o a alargar el PA en función de la contribución relativa de ambas corrientes.

$I_{K(Ca)}$: Canal de potasio activado por Ca^{2+} , ya que se abre en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico que inician la contracción. Esta corriente ayuda a terminar el PA (Coraboeuf y Carmeliet, 1982).

I_{K1} : Corriente de rectificación de entrada. Su papel principal se relaciona con el mantenimiento del potencial de reposo. Sus canales son abundantes en células auriculares, ventriculares y de Purkinje, pero no aparece en células nodales. Es quizá la heterogeneidad de distribución de esta corriente lo que podría explicar los diferentes valores de potencial de membrana de las células cardíacas.

El potencial de reposo se define como un potencial negativo estable que se produce en células no espontáneas. Este potencial se encuentra cercano al potencial de

equilibrio del K^+ debido a la gran permeabilidad que presenta la membrana por este ion. El potencial de membrana está regulado por la I_{K1} o corriente de rectificación anómala.

Esta corriente tiene la peculiaridad de funcionar como una corriente de entrada cuando los potenciales están muy hiperpolarizados. Sin embargo, es raro que esto ocurra. En condiciones normales es una corriente de salida que tiene una rectificación de entrada a potenciales más positivos del potencial de equilibrio de potasio, evitando así una acumulación masiva de potasio en los estrechos espacios extracelulares.

$I_{K(ATP)}$: Corriente rectificadora de entrada sensible a los niveles citoplasmáticos de ATP. Permanece inactiva ante niveles normales de ATP, pero en presencia de concentraciones menores de 0,5 mM de ATP, como es el caso de la isquemia, estos canales se activan favoreciendo el acortamiento del PA.

Cuando el aporte de oxígeno disminuye, en situaciones de isquemia, la concentración de ATP también disminuye lo que induce la activación de la $I_{K(ATP)}$ y la inhibición de la I_{K1} . Todo ello induce el acortamiento del PA. Este acortamiento del PA acelera la inactivación de la I_{CaL} , reduciendo por tanto la contractilidad. Gracias a la menor contractilidad, la demanda energética de la célula disminuye con el consecuente ahorro de ATP. Este mecanismo contribuye en parte a la supervivencia de las células durante situaciones temporales de isquemia, pero también puede dar lugar a arritmias.

$I_{K(Ach)}$: Corriente similar a la I_{K1} pero que se activa por la unión de la acetil-colina (Ach) a su receptor muscarínico. Es un mecanismo importante en la modulación de las propiedades eléctricas del corazón mediante estimulación vagal.

1.2.2.4. CORRIENTE DE CLORO

Los canales selectivos de Cl^- dan lugar a una corriente adicional de repolarización durante la fase de meseta. Estos canales pueden ser activados por proteínas, ATP, y aumento de Ca^{2+} intracelular (Walsh, 1991; Zygmunt y Gibbons, 1991; Ackerman y Claphan, 1993; Matsura y Ehara, 1993).

1.2.2.5. CORRIENTE HIPERPOLARIZANTE (I_f)

Parece ser una de las corrientes implicadas en generar la actividad marcapasos (Difrancesco, 1986). El subíndice f proviene del inglés *funny*, divertido, por las inusuales propiedades de esta corriente. No es una corriente selectiva para K^+ ya que depende de Na^+ y K^+ .

La I_f es una corriente lenta de entrada activada por la hiperpolarización. Está presente sobre todo en células automáticas. Sin embargo, dada su inusual activación durante potenciales muy hiperpolarizados puede que su importancia no sea tanto en la actividad marcapasos de las células nodales como en las células de Purkinje. Sus propiedades de activación están reguladas por la estimulación adrenérgica y colinérgica.

1.2.3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN (E-C) CARDÍACO

El acoplamiento E-C es el proceso que une la excitación eléctrica del miocito a la contracción del corazón. El Ca^{2+} es el regulador central del proceso (para revisión Langer, 1997; Morad y Suzuki, 1997; Katz, 2001; Carafoli, 2002). Es el propio Ca^{2+} quien desencadena la amplificación intracelular, que implica la liberación de más Ca^{2+} que, a su vez, activará las miofibrillas contráctiles, induciendo la contracción.

Hoy en día, el mecanismo de acoplamiento E-C, propuesto por Fabiato (1985a y 1985b), es un hecho ampliamente aceptado. Sin embargo, no fue fácil variar la opinión de algunos científicos que postulaban un acoplamiento mecánico, entre los canales de Ca^{2+} de la membrana y el RS, fenómeno similar al descrito para las células del músculo esquelético (Schneider y Chandler, 1973).

En el mecanismo propuesto por Fabiato (1985a y 1985b), la onda de despolarización, durante el PA, está acoplada a la contracción, por un fenómeno denominado, liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, del inglés *calcium-induced calcium release*).

La secuencia de acontecimientos se inicia con la entrada de Ca^{2+} a través de sus canales (situados en el túbulo T) durante la fase de meseta (fase 2) del PA (figura 9). Aunque la cantidad de Ca^{2+} que entra no es suficiente para inducir la contracción celular, activa la liberación de más Ca^{2+} del RS a través de los RyRs (figura 10). Se podría decir, por tanto, que el canal de Ca^{2+} tipo L, situado en el túbulo T, actúa como un sensor de voltaje que induce la liberación de Ca^{2+} del RS, quién a su vez, amplifica

la señal. La cantidad de Ca^{2+} liberada por el RS es suficiente para producir un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que se unirá a la troponina C, activando la maquinaria contráctil (Figura 10).

1.2.3.1. TEORÍA DEL CONTROL LOCAL DE Ca^{2+}

La primera teoría que explicaba el fenómeno de CICR suponía el aumento global de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como el activador de los RyRs. Sin embargo, era difícil explicar como pequeños cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, debidos a la entrada de Ca^{2+} por su canal, podían regular la gran cantidad de Ca^{2+} liberada por el RS. Ello suponía una gran sensibilidad de los RyRs, ya que pequeñas variaciones del ion, inducían la activación total de los RyRs. Si la teoría aceptada hasta aquel momento resultaba cierta, la respuesta esperada sería de todo o nada, ya que pequeñas cantidades de Ca^{2+} serían capaces de activar todos los RyRs y la contracción siempre sería máxima.

Fue Stern (1992) quien propuso, por primera vez, mediante cálculos teóricos que el RS no se activaba por el aumento global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sino más bien, por el aumento local que tenía lugar en el espacio restringido, entre los canales de Ca^{2+} tipo L y los RyRs. En el caso de que la teoría del control local de Ca^{2+} fuera cierta, la respuesta sería gradual (Callewaert, 1992; Wier y cols., 1994), circunstancia mucho más relevante fisiológicamente.

Esta teoría se apoyaba en el hallazgo de que la apertura de un canal de Ca^{2+} tipo L correspondía con la apertura de uno o varios RyRs, que liberaban el Ca^{2+} en forma de elevaciones no propagativas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o *sparks* de Ca^{2+} (destellos) (Cheng y cols., 1993, para revisión Wier y Balke, 1999). De hecho, se demostró que un simple canal de Ca^{2+} inducía un *spark* de Ca^{2+} (López-López y cols., 1995; Santana y cols., 1996; Wang y cols., 2001b) y que la ocurrencia de los sparks dependía del cuadrado de la corriente unitaria de Ca^{2+} (Santana y cols., 1996).

Si el control de Ca^{2+} es local, ello implica que los RyRs son relativamente insensibles al Ca^{2+} , y, sólo altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidas en las cercanías del canal de Ca^{2+} tipo L activarán la liberación de más Ca^{2+} del RS (Santana y cols., 1996). Como el Ca^{2+} difunde rápidamente, es lógico pensar que la distancia física del canal de Ca^{2+} tipo L y el RS es pequeña (Santana y cols., 1996). La correlación entre las dos estructuras se

ponía de manifiesto pues existía buena concordancia entre la duración de apertura del canal de Ca^{2+} tipo L y la liberación de Ca^{2+} del RS (Bouchard y cols., 1995).

En la teoría local de Ca^{2+} es importante la proximidad anatómica entre el canal de Ca^{2+} y los RyRs (separados solamente por una pequeña zona) (figura 6 y 10). Así, se cree que la I_{CaL} induce un cambio conformacional en el pie del RyR, favoreciendo su apertura. La hipótesis afirma que cuando se abre un canal de Ca^{2+} tipo L, el incremento local de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa un pequeño grupo (*cluster*) de RyRs produciendo un *spark* de Ca^{2+} (Cannell y cols., 1994; Ritter y cols., 2000).

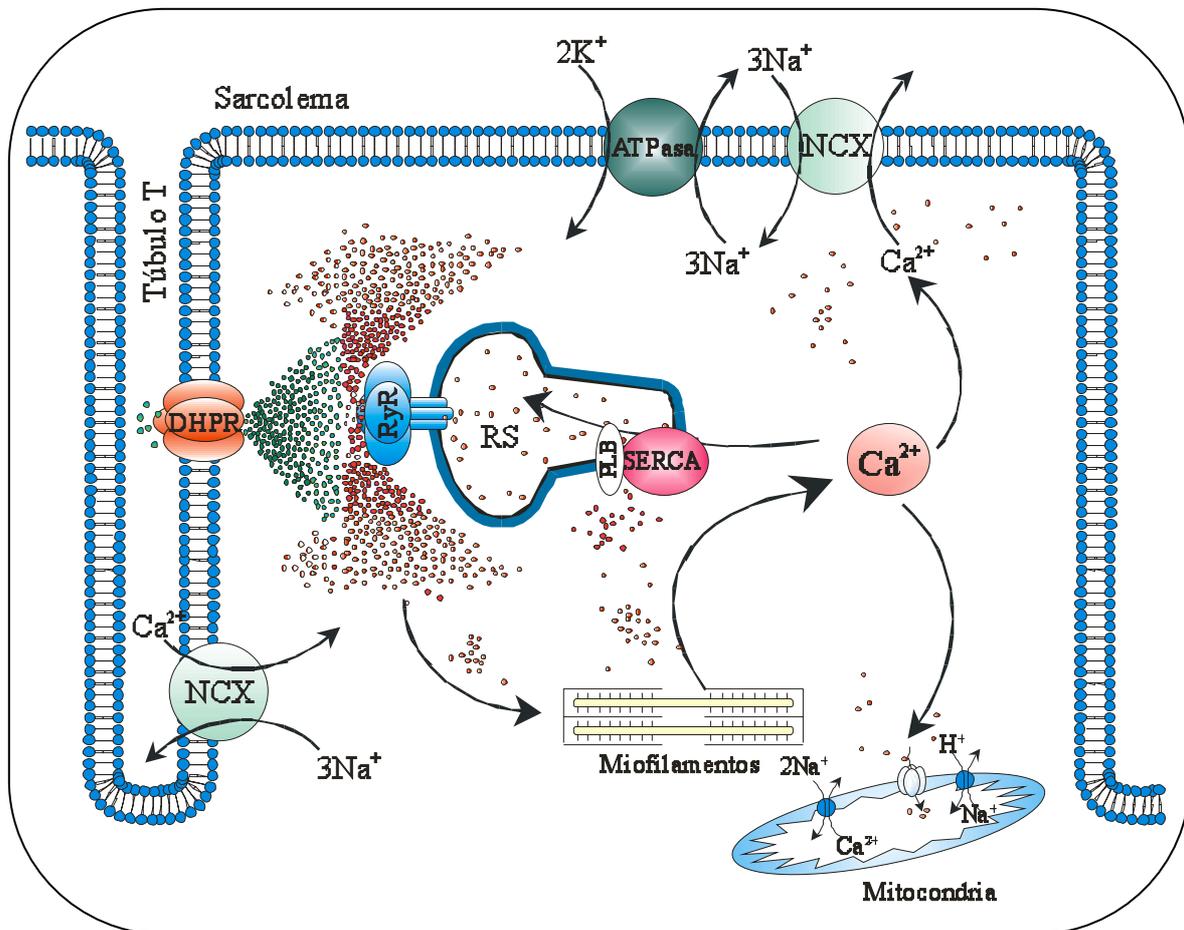


Figura 10. Esquema general del ciclo del Ca^{2+} en un miocito cardíaco. El Ca^{2+} que entra por el canal de Ca^{2+} (DHPR) o por el intercambiador $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) activa el RyR del RS. Posteriormente, el Ca^{2+} es retirado de los miofilamentos y del citosol mediante la activación de la SERCA del RS y del NCX. La mitocondria también puede recoger Ca^{2+} y almacenarlo, aunque es una vía minoritaria. PLB: fosfolambano. El Ca^{2+} se representa como esferas verdes (cuando entra por el canal de Ca^{2+}) o esferas rojas (cuando sale del RS). (Modificado de Bers, 2002).

Aunque el número de RyRs que se abren simultáneamente para producir un *spark* de Ca^{2+} es incierto, si parece claro que el transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se puede explicar como el sumatorio espacial y temporal de los *sparks* de Ca^{2+} liberados de forma

local (Cannell y cols., 1994). Los *sparks* de Ca^{2+} (figura 21 de Material y Métodos) son pequeñas cantidades de Ca^{2+} (unos 6616 iones por *spark* de Ca^{2+}) (Gómez y cols., 1996) que se liberan, de forma espontánea y local, del RS incluso en ausencia de I_{CaL} (Gómez y cols., 1996). Un *spark* de Ca^{2+} es el aumento rápido, localizado y breve de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Representa la apertura de un grupo de RyRs actuando en concierto. Se les denomina unidades elementales de la liberación del RS y su capacidad de difusión es tan pequeña que por sí solos no pueden disparar la contracción. Sin embargo, durante el acoplamiento E-C se activan de forma sincronizada un gran número de *sparks* de Ca^{2+} , originando un transiente de Ca^{2+} global que sí originará la contracción.

1.2.3.2. MECANISMOS DE ACTIVACIÓN DEL RS

➤ Corriente de Ca^{2+} (I_{CaL})

Las características electrofisiológicas de esta corriente se explicaron extensamente en el apartado 1.2.2.2 de esta sección. Sin embargo, es importante enfatizar algunos aspectos relacionados con el disparo del acoplamiento E-C.

La despolarización de la membrana induce la activación de la corriente, pero la cantidad de Ca^{2+} que entra en el citosol está limitada por la inactivación dependiente de Ca^{2+} , mediada por calmodulina (Peterson y cols., 1999; Zühlke y cols., 1999) y por el propio Ca^{2+} liberado del RS (Adachi-Akahane y cols., 1996; Scriven y cols., 2000). Por tanto, la liberación de Ca^{2+} del RS y la I_{CaL} generan mecanismos de retroalimentación negativa en la entrada de Ca^{2+} .

De hecho, la entrada total de Ca^{2+} a través de la I_{CaL} se reduce, aproximadamente, un 50% cuando comienza la liberación de Ca^{2+} del RS (Bers y Pérez Reyes, 1999). A este respecto, se ha visto que en situaciones de insuficiencia cardíaca, donde la liberación de Ca^{2+} del RS se encuentra disminuida, la inactivación de I_{CaL} , dependiente de Ca^{2+} es menor, lo que ayuda a la prolongación del PA (Ahmmed y cols., 2000). Es más, cuando la frecuencia de estimulación aumenta, también se vuelve más lenta la inactivación dependiente de Ca^{2+} . A este fenómeno se le denomina facilitación y es dependiente del Ca^{2+} liberado por el RS (Delgado y cols., 1999; Barrere-Lemaire y cols., 2000). Si las estimulaciones son demasiado seguidas, al RS no le da tiempo a cargarse y por tanto, el transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ será menor (Delgado y cols., 1999). El resultado final será la entrada de Ca^{2+} durante más tiempo a través del canal. Es

interesante reseñar que en corazones insuficientes humanos no se observa este fenómeno (Barrere-Lemaire y cols., 2000).

La rápida inactivación de la I_{CaL} permite medir el curso temporal de la liberación del Ca^{2+} del RS (alcanza el pico en 2 ó 3 ms) (Puglisi y cols., 1999). Este dato confirma el pequeño retraso esperado entre la I_{CaL} y la liberación de Ca^{2+} del RS durante el acoplamiento E-C debido a la pequeña medida de la hendidura diádica (Zahradniková y cols., 1999).

➤ Otras vías de entrada

Hasta el momento sólo se ha citado la entrada de Ca^{2+} al citosol a través de los canales de Ca^{2+} tipo L. No obstante, aunque son vías minoritarias, también se han descrito otras rutas alternativas para el flujo de este catión divalente al interior celular.

Así, el Ca^{2+} podría fluir al citosol debido al funcionamiento en modo reverso del **intercambiador Na^+/Ca^{2+}** (incorporando un ion Ca^{2+} y sacando tres iones Na^+) (figura 10), cuando el potencial se vuelve más positivo (Kohmoto y cols., 1994; Levi y cols., 1994; Litwin y cols., 1998). Sin embargo, cuando tanto la I_{CaL} como la corriente de entrada del intercambiador coexisten, esta última es mucho menos efectiva y más lenta que la I_{CaL} en el disparo del acoplamiento E-C (Sipido y cols., 1997).

Otra hipótesis apunta que los iones Na^+ que entran rápidamente por su canal, se acumulan en una microzona (hendidura diádica o *fuzzy zone*) (Lederer y cols., 1990; Levesque y cols., 1994; Lipp y Niggli, 1994) haciendo que el intercambiador funcione en modo reverso (introduciendo Ca^{2+} en la célula) e incluso activando directamente la liberación de Ca^{2+} del RS (Leblanc y Hume, 1990). Esta hipótesis ha sido rechazada por otros autores que sostienen que los canales de Na^+ no están tan próximos de la hendidura diádica (Scriven y cols., 2000).

Aunque en situaciones fisiológicas, esta vía no tenga importancia, debido a la primacía de la I_{CaL} , puede adquirirla cuando la concentración de Na^+ intracelular sea elevada, cuando la I_{CaL} esté disminuida o cuando el intercambiador se exprese de forma exacerbada.

Algunos autores (Sipido y cols., 1998; Zhou y January, 1998) han respaldado la idea de que el **canal de Ca^{2+} tipo T** también puede contribuir en el acoplamiento E-C. Sin embargo, este canal no es funcional en la mayoría de los ventrículos cardíacos y en las zonas donde se encuentra (células de Purkinje) su capacidad de activar los RyRs es

mucho más débil porque no se sitúan cerca de las hendiduras diádicas, lo que los convierte en colaboradores secundarios del acoplamiento E-C (Bers, 2002).

Asimismo, algunos estudios afirman que, en ausencia de Na^+ extracelular, el Ca^{2+} puede entrar a la célula e inducir la liberación de más Ca^{2+} , a través de una **corriente de Ca^{2+} sensible a TTX** ($I_{\text{Ca, TTX}}$) (Lemaire y cols., 1995). No obstante, aunque no parece muy probable que en condiciones normales, entre Ca^{2+} por el canal de Na^+ , algunos autores afirman que sustancias como los agonistas β -adrenérgicos o los glucósidos cardiotónicos, varían la selectividad del canal, haciéndolo más afín por el Ca^{2+} que por el Na^+ (a este efecto se le ha denominado en inglés *slip mode conductance*, *conductancia resbaladiza*) (Santana y cols., 1998; Cruz, 1999).

A pesar de la creciente evidencia de que el acoplamiento E-C depende de la entrada de Ca^{2+} no faltan estudios que sugieren un mecanismo desencadenado por la **variación del potencial de membrana**, que no necesita el influjo de Ca^{2+} para activar los RyRs y desencadenar el proceso de contracción (Ferrier y cols., 2000; Ferrier y Howlett, 2001). Sin embargo, esta teoría ha sido descartada por otros autores (Wier y Balke, 1999; Piacentino y cols., 2000).

Por último, es interesante mencionar que también se ha propuesto al **IP₃** como posible desencadenante de la liberación de Ca^{2+} del retículo, como ocurre en las células del músculo liso vascular. En el RS de células cardíacas, predomina la isoforma 2 del receptor de IP₃ (Pérez y cols., 1997), pero son necesarias concentraciones elevadas de la molécula, para activar la liberación de Ca^{2+} y por el momento no se ha demostrado que el IP₃ se genere como consecuencia del PA (Kentish y cols., 1990).

1.2.3.3. PAPEL DE RS EN EL ACOPLAMIENTO E-C

Los componentes fundamentales para la liberación de Ca^{2+} del RS, son los RyRs. Estos actúan como complejos funcionales junto con otras proteínas, como la FKBP 12.6 (Marx y cols., 2000), la sorcina etc. Esta propiedad del RyR se corrobora con la observación de *sparks* de Ca^{2+} o de transientes locales de Ca^{2+} .

La liberación de Ca^{2+} , en forma de *sparks* de Ca^{2+} , es regulada por el RS, en función de lo cargado que se encuentre. Por ejemplo, si la carga de Ca^{2+} , en el RS, es elevada aumenta la cantidad de Ca^{2+} disponible para la liberación y también la fracción de Ca^{2+} liberada para cada disparo inducido por la I_{CaL} (Shannon y cols., 2000). Esto se

debe a que el propio Ca^{2+} del interior del RS estimula la probabilidad de apertura del RyR (Sitsapesan y Williams, 1994) e induce la liberación espontánea de Ca^{2+} típica de las postcontracciones que pueden dar lugar a arritmias o actividad contráctil no sincronizada (Bers, 2002). Sin embargo, cuando la concentración del Ca^{2+} del RS es baja, la I_{CaL} puede fallar en la activación del RS (Shannon y cols., 2000), hecho que permite la recarga del mismo porque el Ca^{2+} fluye más tiempo tanto por los canales de Ca^{2+} tipo L (porque hay menos inactivación) como a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

1.2.3.4. ELIMINACIÓN DEL Ca^{2+} DESPUÉS DE LA CONTRACCIÓN

No se sabe exactamente cual es la señal que hace que el proceso de liberación de Ca^{2+} inducido por Ca^{2+} termine. Parece ser que los RyRs se inactivan (Fabiato, 1985b; Sham y cols., 1998) o se adaptan a las altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Györke y Fill, 1993), y el RS se vacía parcialmente.

En cualquier caso, una vez finalizado el proceso contráctil, todo el Ca^{2+} que se ha movilizado en el interior celular deberá retornar a su lugar de origen. Para ello, la célula tiene varios dispositivos, tanto en el sarcolema, como en el RS (figura 10).

En el sarcolema, es el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ quien se encarga, principalmente, de sacar el Ca^{2+} al exterior (intercambia tres Na^+ por un Ca^{2+}), aunque hay una pequeña contribución por parte de la bomba de Ca^{2+} . En el RS es la SERCA, quien vuelve a incorporar el Ca^{2+} a su lugar de reserva.

La importancia cuantitativa de sendas rutas depende de las especies. Por ejemplo, en el conejo (Bassani y cols., 1994) la vía mayoritaria de extrusión de Ca^{2+} es la SERCA (70%) seguida del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (28%), quedando sólo un remanente de Ca^{2+} de un 2% que es eliminado por los llamados sistemas lentos de recogida, la mitocondria y la bomba de Ca^{2+} del sarcolema. Sin embargo, en la rata la actividad de la SERCA es mayor (ya que hay mayor concentración de bombas en el RS), quedando la relación en un 92% para la SERCA, un 7% para el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y un 1% para los sistemas lentos de recogida (Hove-Madsen y Bers, 1993). El balance en el ratón (Li y cols., 1998) es similar a la rata, mientras que la relación en el ventrículo de hurón, del perro, del gato, del cobayo y del hombre (Bers, 2002) es parecido al conejo.

En general, se acepta que la cantidad de Ca^{2+} que sale por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es equivalente a la cantidad de Ca^{2+} que entró por el canal de Ca^{2+} tipo L, y la cantidad de Ca^{2+} transportada por la SERCA es similar a la cantidad liberada por el RS. De esta forma, la cantidad total de Ca^{2+} en la célula, se conserva en cada latido.

Se han encontrado varios subtipos de SERCA, pero es la de tipo 2 la que predomina en el corazón (Lompré y cols., 1994). Constituye, aproximadamente, el 40 % del componente proteico del RS y es el principal mecanismo para reducir el Ca^{2+} citosólico e iniciar la diástole. Por cada molécula de ATP que se hidroliza, dos iones Ca^{2+} se acumulan en el RS. La SERCA, es una bomba de Ca^{2+} pero difiere en muchos aspectos de la bomba de Ca^{2+} del sarcolema. Una de sus principales diferencias se basa en que se encuentra modulada (inhibida) por el fosfolambano (Tada y Katz, 1982).

El fosfolambano es un péptido que forma parte de la membrana del RS longitudinal y se localiza junto a la SERCA. En condiciones normales, la SERCA está inactivada por el fosfolambano. Sin embargo, cuando se produce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o por la estimulación β -adrenérgica, éste se fosforila, disociándose de la SERCA y acelerando la recaptación del Ca^{2+} al RS. El fosfolambano tiene tres lugares de fijación para distintas proteínas quinasas. Así, tiene una tirosina donde se une una quinasa dependiente de calmodulina, una serina donde se une la PKA y otra serina donde se une la PKC (para revisión, Brittsan y Kranias, 2000)

Durante la estimulación β -adrenérgica, se activa el funcionamiento de la SERCA y como consecuencia el RS se carga más. Ello implica que en las siguientes contracciones se libere más Ca^{2+} que a su vez fosforilarán al fosfolambano en otros lugares específicos, favoreciendo la relajación. Así, por un lado la fosforilación del fosfolambano favorece la relajación (efecto lusitropico) e indirectamente favorece la respuesta inotrópica positiva (Luo y cols., 1994).

Además de las rutas, mencionadas en párrafos superiores, que controlan la eliminación del Ca^{2+} una vez que el proceso contráctil ha finalizado, existe una autoregulación del propio Ca^{2+} . Este sistema, regido por la proteína calmodulina, es un factor crítico que actúa como un sensor intracelular de Ca^{2+} (Cheung, 1980). La calmodulina es una cadena polipeptídica que tiene cuatro dominios específicos para la unión del Ca^{2+} . Mientras no hay Ca^{2+} , los cuatro lugares están ocupados por magnesio. No obstante, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta, el magnesio es desplazado por el Ca^{2+} de tres

de los sitios de unión. La forma activa Ca_3Mg_1 -calmodulina aumenta la actividad de las bombas del RS y del sarcolema cuando el Ca^{2+} citosólico es alto. Por su parte, inhibe la liberación de Ca^{2+} de los RyR por reducción directa del tiempo de apertura (Smith y cols., 1989).

1.3. NEUROPEPTIDO Y (NPY)

1.3.1. ASPECTOS GENERALES

El NPY pertenece a la familia de los polipéptidos pancreáticos, que incluye también una hormona pancreática (polipéptido pancreático (PP)) y una hormona intestinal (péptido YY (PYY)). Es uno de los péptidos más abundantes en el cuerpo y posee una gran cantidad de receptores, distribuidos por todo el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Tatemoto, 1982b). Tanto al NPY como al resto de los péptidos activos, presentes en el organismo, se les atribuyen acciones como neurotransmisores (se almacenan en vesículas presinápticas simpáticas, son liberados gracias a la estimulación eléctrica y actúan sobre receptores específicos), hecho, que hizo variar, en su día, algunos conceptos clásicos sobre el Sistema Nervioso Autónomo.

Desde su aislamiento, en 1982, (Tatemoto, 1982b) se le ha implicado en muchas funciones centrales, como orexígeno (sustancia inductora del apetito) (Colmers y Bleakman, 1994), inhibidor de la ansiedad (Wettstein y cols, 1995), potenciador de la memoria (Thorsell y cols., 2000), regulador del ritmo circadiano (Yannielli y Harrington, 2001), y en procesos mediadores de analgesia e hiperalgesia (Wang y cols., 2000). Por supuesto, también se le atribuyen acciones en la regulación del SNP, tales como vasoconstricción (Michel y Rascher, 1995), inhibición de la liberación de insulina (Wang y cols., 1994), regulación de la motilidad intestinal (Sheikh, 1991) y de la secreción gastrointestinal y renal (Playford y Cox, 1996).

1.3.1.1. DESCUBRIMIENTO

La historia del NPY comienza en el final de los años 60, cuando Kimmel y cols. (1968 y 1975) aislaron la insulina del páncreas de pollo y descubrieron también el PP, aunque este último tenía relativa importancia fisiológica. Sin embargo, debido a su descubrimiento, continuaron las investigaciones y se aislaron el PYY y el NPY. En 1980, utilizando una técnica para aislar péptidos con el carbono terminal amídico, Tatemoto y Mutt, (1980) afirmaron que tanto el cerebro como el intestino del cerdo contenían grandes cantidades de un péptido parecido al PP. Al péptido, similar al PP, que se aisló en el intestino, se le denominó péptido YY (PYY) porque su secuencia peptídica comenzaba y terminaba con un aminoácido tirosina ("Y" es la abreviatura para la tirosina en el código de letras simples de los aminoácidos). Al principio, se pensó que el PYY (Tatemoto, 1982a) se encontraba tanto en el intestino como en el

cerebro, pero posteriormente, se demostró que el péptido mayoritario en el cerebro era diferente del PYY y debido a que se encontraba allí en grandes cantidades, se le llamó neuropéptido Y (Tatemoto, 1982b; Tatemoto y cols., 1982). Finalmente, el cuarto péptido perteneciente a la familia fue aislado en el pez (Andrews y cols., 1985) y se le denominó péptido pancreático Y (PY).

1.3.1.2. ESTRUCTURA

El NPY posee una secuencia de 36 aminoácidos que se ha mantenido casi invariable a lo largo de la evolución de las especies (figura 11), lo que indica su gran importancia fisiológica. De hecho, la secuencia peptídica se conserva casi intacta (33 de 36 aminoácidos) desde el *Torpedo marmorata* hasta los mamíferos. De su estructura primaria destaca el carbono terminal de carácter amídico y el gran número de residuos de tirosina (Y), incluyendo el principio y el final de la molécula. La estructura terciaria del péptido es común en toda la familia PP y ha sido estudiada mediante la técnica de difracción de rayos X y más recientemente, por técnicas de cristalografía (Larhammar, 1996). Dicha estructura tiene forma de “U” y la forman dos hélices antiparalelas, la hélice N terminal, que contiene varios residuos de prolina (residuos del 1 al 13), y una larga α -hélice, de carácter anfipático (residuos del 19 al 32), ambas conectadas por una curva de horquilla o lámina β (residuos del 14 al 18). Las dos hélices se mantienen juntas por medio de residuos hidrofóbicos (prolinas en posiciones 2, 5 y 8). Los residuos (15-31) contienen la secuencia hidrofílica básica denominada en inglés *PP-fold*. Los residuos hidrofílicos del carbono amídico terminal (33-36) se proyectan hacia fuera desde la curva de horquilla. Es curioso, que dada la estructura peculiar del NPY, carente de enlaces covalentes (que estabilicen la estructura), sea estable en solución acuosa, tal y como indican los estudios de dicroísmo circular (Glover y cols., 1984).

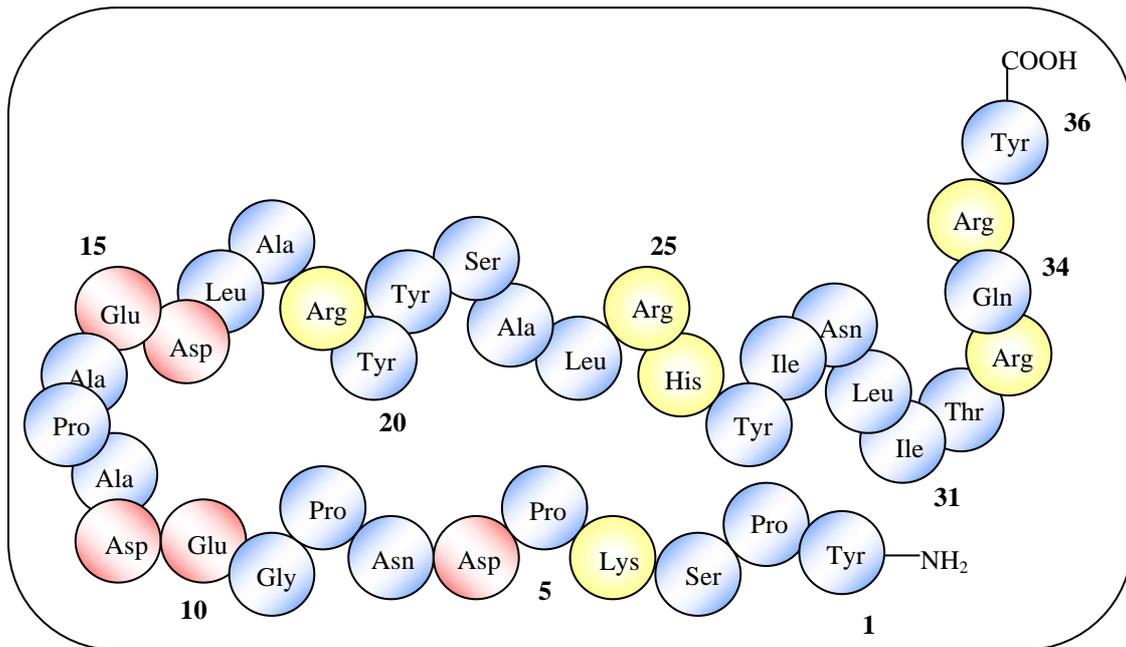


Figura 11. Esquema de la estructura del NPY porcino. Se representan en azul los aminoácidos sin carga, en amarillo aquellos con carga positiva y en rojo los que tienen carga negativa. (Modificado de Fuhlendorff y cols., 1990).

La estructura terciaria es vital para la interacción de la molécula con los receptores. Sin embargo, otros aspectos estructurales también son importantes en la funcionalidad del péptido. Así, por ejemplo, la secuencia 33-36 es esencial en el reconocimiento del receptor y al carbono amídico terminal se le relaciona con la unión al receptor y con algunos efectos biológicos. Por su parte, el aminoácido 34 muestra especificidad de unión al receptor y el nitrógeno terminal dirige la estabilización conformacional. La secuencia completa de NPY es necesaria para la interacción con el receptor Y_1 , mientras que los fragmentos del carbono terminal son selectivos para el receptor Y_2 .

1.3.1.3. BIOSÍNTESIS DEL NPY

A diferencia de la NA, que se sintetiza en las terminaciones nerviosas, el NPY se sintetiza en las neuronas de los ganglios simpáticos como un precursor y, posteriormente, es procesado y transportado en vesículas a las terminaciones nerviosas (Potter y Ulman, 1994).

El ADN complementario (ADNc) que codifica para el NPY humano se obtuvo, por primera vez, de un feocromocitoma (Minth y cols., 1986), un tumor de la médula

adrenal que contiene grandes cantidades de NPY. El correspondiente ARN mensajero (ARNm) codifica para un precursor simple de NPY, compuesto por 97 aminoácidos. De los 97 aminoácidos, 28 componen una cadena hidrofóbica, necesaria para penetrar en el retículo endoplásmico (y por tanto, entrar en el compartimento secretor de la célula). Una vez dentro, la secuencia que actúa de mensajero es eliminada, quedando, por tanto, una prohormona de 69 aminoácidos. Aunque no es común en el resto de los péptidos, el NPY sólo posee una secuencia de 33 aminoácidos que se sitúan al lado del carbono terminal (generalmente, hay otra secuencia situada en el otro flanco, en el amino terminal). Tres de estos aminoácidos, glicina, lisina y arginina son necesarios para la amidación. El péptido que se forma después de la amidación del NPY (compuesto por 30 aminoácidos), se denomina CPON (del inglés *C-flanking peptide of NPY*, *péptido que flanquea el carbono terminal del NPY*) y por el momento no se conoce su utilidad fisiológica, aunque probablemente se libere junto con el NPY (Wahlestedt y Reis, 1993).

Una gran variedad de moléculas y cascadas intracelulares son capaces de modular la biosíntesis del NPY. Así, se han descrito agentes que estimulan o inhiben el proceso. Como agentes estimuladores cabe destacar los esteroides (Higuchi y cols., 1988; Sahu y cols., 1992), algunos neurotransmisores (Magni y Barnea, 1993), ciertos factores de crecimiento (Minth-Worby, 1994; Chan y cols., 1996) o activadores de los mediadores PKA y PKC (Sabol e Higuchi, 1990; Magni y Barnea, 1993), entre otros. Sin embargo, como agentes inhibidores de la biosíntesis destaca la leptina (hormona secretada por el tejido adiposo) (Zhang y cols., 1994).

1.3.1.4. DISTRIBUCIÓN DEL NPY EN EL ORGANISMO

En la periferia el NPY se encuentra en la mayoría de los nervios simpáticos, sobre todo alrededor de diversos lechos vasculares (Dumont y cols., 1992). También está distribuido en vasos periféricos no adrenérgicos, entéricos, corazón y nervios parasimpáticos.

En el cerebro se encuentra distribuido de forma mayoritaria en estructuras límbicas, alrededor de la corteza cerebral, en el hipotálamo, en el tallo cerebral y en la médula espinal. En la corteza y el estriado se localiza junto con somatostatina. Sobre todo, en la corteza se sitúa en neuronas gabérgicas (Aoki y Pickel, 1990). También se ha

señalado la existencia de NPY en neuronas monoaminérgicas del tallo cerebral, coexistiendo con NA, adrenalina o serotonina (Wahlestedt y cols., 1990).

1.3.1.5. EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DEL NPY

Es importante reseñar que el NPY puede ejercer sus efectos directamente o bien modular o regular los efectos de otras sustancias. Así, en su día se propusieron tres tipos de efectos, que se representan en la figura 12. En primer lugar, el NPY puede ejercer su efecto de forma directa, por ejemplo, la vasoconstricción manifestada en ciertos lechos vasculares (Edvinsson y cols., 1984) (figura 12, panel superior).

En segundo lugar, puede potenciar el efecto inducido por otro NT (Edvinsson y cols., 1984). A este respecto, se sabe que el NPY favorece la unión del receptor α_{1B} -adrenérgico a las proteínas G, lo que posteriormente desencadena la amplificación de los efectos α -adrenérgicos (inducción de hipertrofia por activación de la proteína quinasa con actividad mitogénica (MAPK), etc.) (Wahlestedt y cols., 1990; Sun y cols., 1998b; Pellieux y cols., 2000) (figura 12, panel inferior izquierda).

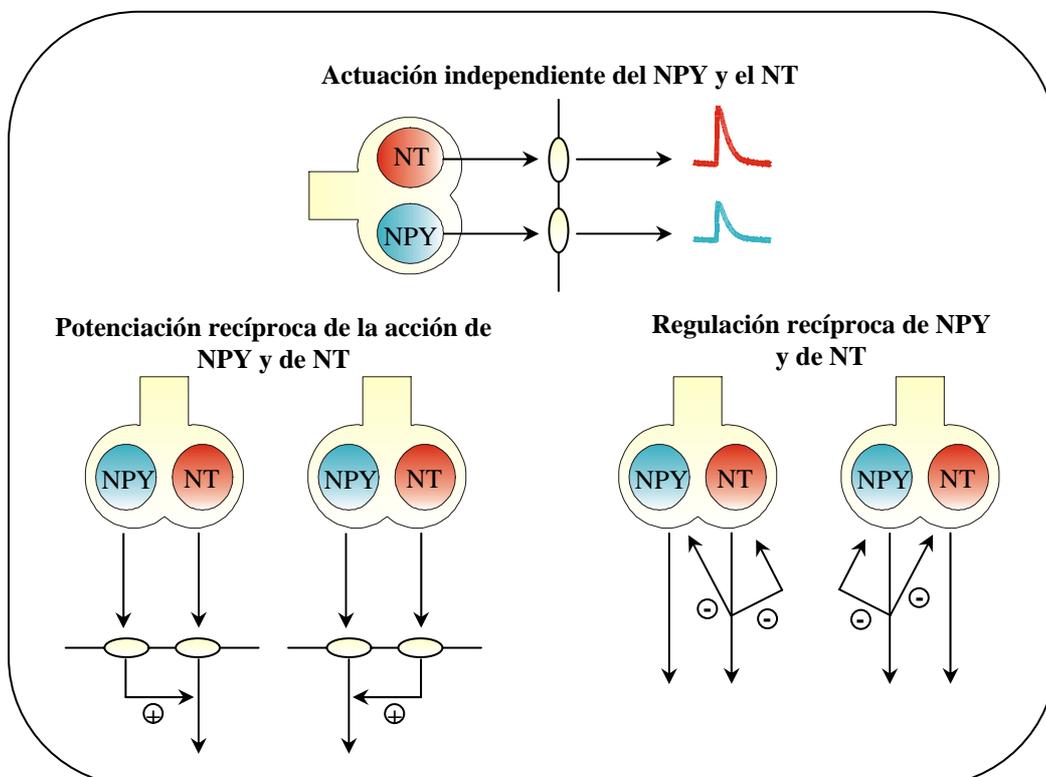


Figura 12. Tipos de interacciones sinápticas de NT y NPY. (Modificado de Wahlestedt y cols., 1993).

Por último, puede tener un efecto presináptico, inhibiendo, por ejemplo, la liberación de NTs tanto de fibras adrenérgicas como colinérgicas (Lundberg y Tatemoto, 1982; Wahlestedt y cols., 1987; Wahlestedt y Reis, 1993) (figura 12, panel inferior derecha). Sin embargo, aunque esta hipótesis es la más aceptada también hay que mencionar que existen algunos estudios que afirman que el NPY no potencia ni modula los efectos postsinápticos de otros NTs (Awad y cols., 1991).

En la mayoría de los casos, el NPY se localiza conjuntamente con otro NT, como por ejemplo, la NA. La liberación conjunta de ambas sustancias está modulada presinápticamente por los receptores α -adrenérgicos y por los receptores de NPY, mediando la autoinhibición, y por los receptores β -adrenérgicos y los receptores de angiotensina II regulando la facilitación (Michel y Rascher, 1995).

A pesar de ello, la liberación puede ser diferencial. Por ejemplo, se sabe que en las neuronas simpáticas la liberación de NPY está favorecida por altas frecuencias, mientras que la de NA está favorecida por bajas frecuencias (Munglani y cols., 1996). De hecho, en pacientes operados de corazón, la liberación de NPY a la circulación no está correlacionada con la liberación de catecolaminas (Hauser y cols., 1996). La posible causa de la potenciación del efecto de un determinado NT, o la inhibición de su liberación, por parte del NPY, podrían estar encaminadas a la mejora de la “economía” de la sinapsis neuroefectora, reflejada en una menor demanda de NT y en la supresión y/o acortamiento de la liberación del NT tras la estimulación nerviosa (Edvinsson y cols., 1987).

1.3.2. RECEPTORES DE NPY

Todos los péptidos pertenecientes a la familia del NPY actúan sobre la misma familia de receptores, conocidos, en general, como “receptores de NPY”. Como se ha mencionado anteriormente, la secuencia de aminoácidos del NPY es muy rica en tirosina (abreviado como letra Y en el código resumido de los aminoácidos) y por ello, a los receptores de NPY se les designa con la letra mayúscula “Y”.

Hasta el momento, han sido clonados cinco tipos distintos de receptores (Y_1 , Y_2 , Y_4 , Y_5 e y_6) pero se ha apuntado la existencia de otro más, el Y_3 . La comparación de sus secuencias correspondientes muestra que los receptores Y_1 , Y_4 e y_6 poseen secuencias similares. Sin embargo, los receptores Y_2 e Y_5 no tienen identidades secuenciales

parecidas entre ellas, ni con los otros tres receptores. Por ello, es difícil dividir los receptores en subfamilias, ya que a pesar de que todos tienen los mismos ligandos (NPY, PYY y PP), sus características estructurales son muy diferentes entre sí. La respectiva relación estructura-actividad de los receptores se ha establecido usando análogos o fragmentos de NPY, PYY y PP (Michel y cols., 1998). Sin embargo, posteriormente se ha visto que la mayoría de las moléculas consideradas como agonistas Y_2 (NPY(13-36), NPY(18-36)) e Y_1 ([Leu³¹,Pro³⁴]NPY) tienen afinidad por otros receptores clonados más recientemente, como el Y_4 o el Y_5 . Por ello, actualmente, se opta por el uso de antagonistas selectivos para su clasificación, para el estudio de los mecanismos endógenos del NPY así como para evaluar qué acciones de NPY pueden representar fenómenos fisiológicos importantes (Pheng y Regoli, 2000). Es más, hoy en día la búsqueda de antagonistas de ciertos receptores de NPY constituye una diana farmacológica importante en la búsqueda de futuras terapias para el tratamiento de la obesidad y de las enfermedades cardiovasculares (Leonardi y cols., 2000).

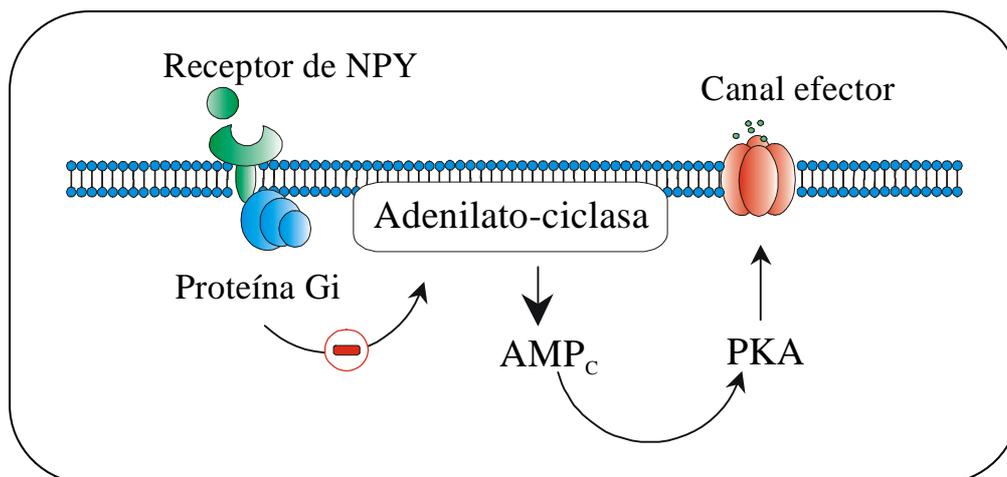


Figura 13. Esquema simplificado de la cascada intracelular de la enzima adenilato-ciclasa inhibida por las proteínas G_i . El signo negativo (en rojo) indica la inhibición por parte de la proteína G_i , de la enzima A-C. (Modificado de Jalife y cols., 1999).

En general, todos los receptores de NPY han sido descritos como miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G y están ligados al menos a tres tipos (las G_i , las G_q y las G_o) (Michel, 1991; Selbie y Hill, 1998). La cascada de transducción más aceptada, asociada con el NPY, se basa en la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (A-C) (figura 13) a través de una proteína G inhibitoria (G_i) (Motulsky y Michel, 1988). El NPY también puede activar la fosfolipasa C (PLC) (Bell y cols., 1997), estimulando, por tanto, la producción de diacilglicerol (DAG) e IP_3 (figura 14). Este

último podría, a su vez, regular la señalización intracelular de Ca^{2+} (Motulsky y Michel, 1988; Mihara y cols., 1989) y el DAG activaría la PKC (Goldberg y cols., 1998).

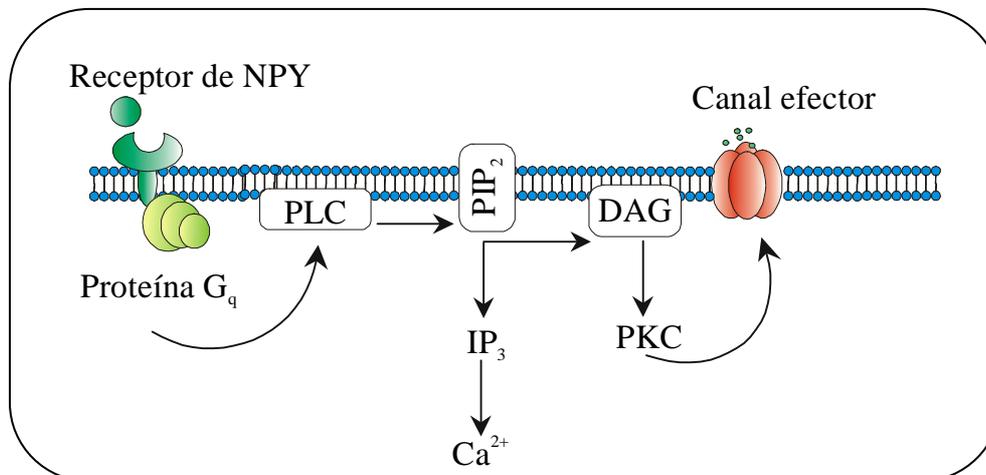


Figura 14. Esquema general de la cascada intracelular de la fosfolipasa C (Modificado de Jalife y cols., 1999).

1.3.2.1. RECEPTORES Y_1

Los receptores Y_1 se clonaron por primera vez en la rata (Eva y cols., 1990). Posteriormente, se identificaron en especies homólogas de ratón (Eva y cols., 1992), del hombre (Larhammar y cols., 1992) y de la especie *Xenopus laevis* (Blomqvist y cols., 1995). En el hombre, se ha determinado que el gen que codifica para el subtipo Y_1 se localiza en el cromosoma 4q(31.3-32) (Eva y cols., 1992; Herzog y cols., 1993).

En general, el NPY se une al receptor Y_1 con mayor afinidad que el PYY y que el PP (Gerald y cols., 1996). Además, existen fragmentos de C-terminal que pueden actuar como agonistas parciales del receptor y en algunas líneas celulares actúan, incluso, como antagonistas (Michel y cols., 1990). Actualmente, se conocen varios antagonistas del receptor Y_1 . Entre ellos destacan el J-115814 (Kanatani y cols., 2001) el SR120819A, el GR 264879A (Daniels y cols., 2001), el H394/84 (Malmström y cols., 2001), el BIBO3304 (Wieland y cols., 1998), y el BIBP3226 (Rudolf y cols., 1994; Wieland y cols., 1995; Doods y cols., 1996). Parece que el más selectivo, por el receptor, es el último de los citados (es el antagonista empleado en la presente Tesis Doctoral), antagonista, por otro lado, de carácter no peptídico.

El receptor Y_1 ha sido detectado, mediante pruebas de ARNm en diversos tejidos humanos, de rata y de ratón (Larsen y cols., 1993; Wharton y cols., 1993; Nakamura y

cols., 1995), entre los que se incluyen el cerebro (Wahlestedt y Reis, 1993; Wang y cols., 2001a), el hipotálamo (Wieland y cols., 1998), el corazón (McDermott y cols., 1997), el riñón (Chevendra y Weaver, 1992), y el tracto gastrointestinal (Chevendra y Weaver, 1992).

Por otro lado, al receptor Y_1 se le asocia con efectos típicos del NPY, tales como la vasoconstricción de la mayoría de los lechos vasculares (Edvinsson y cols., 1987) o el efecto ansiolítico (Wahlestedt y cols., 1993). Actualmente, se acepta que el receptor Y_1 pueda regular la estimulación del apetito (Pedrazzini y cols., 1998; Wieland y cols., 1998; Daniels y cols., 2001; Kanatani y cols., 2001; Mullins y cols., 2001), efecto atribuido, generalmente, al receptor Y_5 . También se han descrito efectos mediados por el receptor Y_1 en el crecimiento celular, por activación de la MAPK (Nie y Selbie, 1998).

1.3.2.2. RECEPTORES Y_2

Se clonó por primera vez a partir de un ADNc procedente de una línea celular humana (SMS-KAN) (Rose y cols., 1995) y posteriormente a partir de librerías de ADNc procedente de cerebro humano (Gehlert y cols., 1996a). Se podría decir que el orden de potencia de unión es más o menos igual para el NPY y el PYY, un poco menor para el fragmento del carbono terminal, y menor, también, para el análogo sustituido con [Pro³⁴] y para el PP. Dada la creciente importancia que está adquiriendo este receptor, surgió la necesidad de desarrollar algunos antagonistas selectivos que permitieran el estudio de las posibles implicaciones biológicas y terapéuticas del mismo. Primero se sintetizó el T_4 -[NPY₃₃₋₃₆] (Grouzmann y cols., 1997) y posteriormente se comercializó un antagonista de carácter no peptídico, BIIE0246, bastante más selectivo que el anterior (Doods y cols., 1999; Dumont y cols., 2000).

Según indican los ensayos de ARN mensajero, los receptores Y_2 han sido detectados en varias zonas del SNC, aunque se encontraron niveles bajos de ARNm en tejidos periféricos humanos (Zhang y cols., 1997b), entre los que cabe destacar el corazón (McDermott y cols., 1997).

La acción que se ha atribuido al receptor Y_2 tiene lugar a nivel presináptico, inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Wahlestedt y cols., 1986; Smith-White y cols., 2001). Además, se ha demostrado que los receptores Y_2 se localizan en

terminaciones nerviosas noradrenérgicas alrededor del hipotálamo, ejerciendo una acción inhibitoria sobre NA (Martire y cols., 1993). Otros estudios han involucrado a los receptores Y_2 en la regulación endocrina, como la liberación de prolactina (Wang y cols., 1996), o la potenciación de la secreción de vasopresina del lóbulo neurointermedio de la rata (Larsen y cols., 1994). Algunas investigaciones, muy recientes, implican a este receptor en el efecto orexígeno, en la motilidad intestinal, en el ciclo circadiano, en la memoria, en la epilepsia y en el dolor (Kaga y cols., 2001). También se ha demostrado que los receptores Y_2 actúan conjuntamente con los Y_1 en la inducción del crecimiento celular a través de la enzima MAPK (Nie y Selbie, 1998).

1.3.2.3. RECEPTORES Y_3

Hasta el momento, el receptor Y_3 no se ha clonado. Sin embargo, algunos estudios apuntaban que existía un lugar de unión más potente para el NPY que para el PYY en diversos modelos experimentales (Grundemar y Hakanson, 1991; Dumont y cols., 1994; Hirabayashi y cols., 1996). Hoy en día, no se tiene ninguna evidencia que afirme la existencia del citado receptor, ya que ni ha sido clonado, ni existen agonistas o antagonistas específicos. Las normas actuales de nomenclatura (Michel y cols., 1998) recomiendan dejar vacante el número tres para asignarlo a aquellos casos donde la afinidad del NPY por el receptor sea mucho mayor que la afinidad del PYY.

1.3.2.4. RECEPTORES Y_4

El receptor Y_4 se clonó por primera vez a partir una la librería genómica humana y se le denominó originalmente “PP1” (Lundell y cols., 1995). La característica principal de este receptor es su gran afinidad por el PP de su misma especie (Berglund y cols., 2001). Es curioso porque homólogos de PP de otras especies tienen 50 e incluso 100 veces menos afinidad por el receptor (Gehlert y cols., 1996b). Parece ser, por tanto, que el resto de los péptidos de la familia tienen poca afinidad por este receptor y que el PP es el ligando endógeno para él.

De nuevo, ensayos de ARNm en humano demostraron la existencia del receptor Y_4 en el colon, en la próstata y en el SNC (Lundell y cols., 1995). En la rata, el receptor se encuentra principalmente en el pulmón (Lundell y cols., 1996).

1.3.2.5. RECEPTORES Y_5

El gen que codifica para el receptor Y_5 , en el hombre, se encuentra en el cromosoma 4q, la misma localización, por tanto, del receptor Y_1 , pero con diferente orientación (Gerald y cols., 1996). El receptor se ha encontrado en varias zonas del cerebro, incluyendo aquellas áreas importantes para la regulación de la ingesta de alimentos (Gerald y cols., 1996; Hu y cols., 1996). También se ha encontrado en los testículos (Pierroz y cols., 1999; Suburo y cols., 2002) y en el corazón de fetos de ratón (Pellieux y cols., 2000). La mayor afinidad por este receptor la tienen el NPY y el PYY, presentando afinidad intermedia algunos análogos como el NPY₂₋₃₆, el PYY₃₋₃₆ y el NPY₁₃₋₃₆. El péptido PP tiene una muy baja afinidad por el receptor de la rata y del hombre.

Actualmente, se conocen agonistas (Balasubramaniam y cols., 1994; Cabrele y cols., 2000; Parker y cols., 2000) y antagonistas (Kanatani y cols., 2000a; Yokosuka y cols., 2001) selectivos de este receptor, que facilitan en gran medida el estudio de las respuestas fisiológicas mediadas por la familia de los polipéptidos pancreáticos.

A este receptor se le atribuyen efectos reguladores de la ingesta de alimentos (Gerald y cols., 1996; Kanatani y cols., 2000a; Yokosuka y cols., 2001) y juega un papel importante en la modulación de la transmisión excitatoria del hipotálamo (Guo y cols., 2002). Además, se le ha implicado en procesos de remodelación cardíaca, por activación de factores de crecimiento y potenciación de la activación de señales mitogénicas, inducidas por sustancias de carácter α -adrenérgicas (Pellieux y cols., 2000).

1.3.2.6. RECEPTORES y_6

El receptor y_6 se clonó por primera vez en el ratón (Weinberg y cols., 1996). Se caracteriza por ser un pseudogen en los primates y no estar presente en la rata (Burkhoff y cols., 1998). Se localiza en el cromosoma 5, en la región 5q31 (Gregor y cols., 1996). Se ha encontrado ARNm para este subtipo en tejidos humanos que incluyen el corazón y el músculo esquelético (Gregor y cols., 1996). La afinidad de los péptidos de NPY por dicho receptor no ha sido demostrada y su perfil farmacológico tampoco.

1.3.3. RELEVANCIA FISIOLÓGICA Y PATOLÓGICA DEL NPY

Las funciones fisiológicas del NPY son difíciles de evaluar. No hay que olvidar que su efecto puede variar durante el desarrollo (Sun y cols., 1991) y, tampoco puede obviarse que la existencia de diferentes neuropéptidos es una consecuencia de la evolución. Por tanto, es factible que el péptido tenga importancia en especies inferiores y que haya sido relevado por otras moléculas más eficaces. Todo ello, sumado a las posibles interacciones con otras sustancias (dejando al descubierto el efecto sólo cuando las dos están presentes) hacen muy ardua la búsqueda y explicación de los efectos del NPY. Incluso en el caso de encontrar algún efecto, tampoco resulta fácil probar el papel fisiológico del mismo (Beaulieu y Lambert, 1998).

1.3.3.1. EFECTOS CENTRALES DEL NPY

El NPY se encuentra ampliamente distribuido tanto en el cerebro de la rata como en el del hombre o en otras especies (Wang y cols., 2001a), encontrándose los niveles más elevados en el hipotálamo y en la amígdala (Heilig y Widerlöv, 1990). El mayor número de neuronas de NPY están localizadas en el núcleo arcuato del hipotálamo (Heilig y Widerlöv, 1990) y algunas de estas neuronas vierten y proyectan su neurosecreción en el núcleo paraventricular (Liposits y cols., 1988). En la corteza cerebral aparece junto con el ácido γ -aminobutírico (GABA) y junto con la somatostatina (Aoki y Pickel, 1990).

Se ha descrito que el NPY regula una serie de acciones fisiológicas que incluyen el apetito y el consumo de etanol (Daniels y cols., 2001; Kelley y cols., 2001; Guo y cols., 2002), la ansiedad y el sueño (Antonijevic y cols., 2000; Britton y Southerland, 2001), el aprendizaje y la memoria (Redrobe y cols., 1999), el dolor (Wang y cols., 2000), la actividad anticonvulsivante (Vezzani y cols., 1999), el ciclo circadiano (Yannielli y cols., 2001), y la fertilidad (Kalra y Kalra, 1996). Algunas de ellas se detallan en las páginas siguientes.

➤ Regulación del apetito

Actualmente, existe la certeza de que el NPY actúa como orexígeno, tanto en vertebrados (Kaye y cols., 1990; Daniels y cols., 2001; Magni y cols., 2001) como en invertebrados (Narnaware y cols., 2000). La regulación que ejerce el NPY sobre la

ingesta se ha demostrado incluso en fetos, indicando la importancia del péptido en la maduración funcional de la regulación del apetito (Roberts y cols., 2000). Parece ser que la regulación del apetito, del peso corporal, y del balance energético, mediada por el NPY, tiene lugar en el hipotálamo (Williams y cols., 2000). De hecho, la inyección del péptido en los ventrículos cerebrales (Clark y cols., 1984) o en el núcleo paraventricular del hipotálamo (centro de la saciedad) (Stanley y Leibowitz, 1984) induce una respuesta desmedida en la ingesta que llega, incluso, a desencadenar un síndrome con características similares a la obesidad, si la administración es crónica (Stanley y cols., 1986; Vettor y cols., 1994). Algunos estudios, realizados en modelos animales de anorexia nerviosa, bulimia y obesidad (Kaye y cols., 1990) certifican que el NPY endógeno puede regular el apetito, ya que animales a los que se les sometía a ayuno, incrementaban el contenido y la liberación de NPY en el hipotálamo, mientras que la realimentación revertía los efectos (Sahu y cols., 1988; Brady y cols., 1990; Minami y cols., 1995). Por otro lado, se ha visto que la estabilización del peso en pacientes con desórdenes alimentarios, o el tratamiento con fármacos que reducen el apetito (como la fenfluramina) hacen disminuir los niveles hipotalámicos de NPY (Kaye y cols., 1990; Rogers y cols., 1991).

A este respecto, también es conveniente resaltar que el NPY limita el gasto de energía mediante un efecto inhibitorio sobre el tejido adiposo marrón (ayudando, por tanto, a mantener las reservas energéticas). Consecuentemente, la exposición al frío produce el proceso inverso. Es decir, se inhibe la liberación hipotalámica de NPY, permitiendo la termogénesis del tejido adiposo marrón (McCarthy y cols., 1993). Este hecho explicaría que niveles altos de NPY generen hipotermia en algunos modelos que utilizan roedores como animales de experimentación (McCarthy y cols., 1993; Pedrazzini y cols., 1998).

El NPY participa en este proceso junto con otras moléculas bioactivas, como las hormonas peptídicas y la leptina (Zhang y cols., 1994). De hecho, algunos estudios postulan que estos agentes son capaces de regular el metabolismo energético, por medio de la inhibición de la expresión del NPY (Stephens y cols., 1995; Erickson y cols., 1996; Magni y cols., 2001). En este sentido, algunas investigaciones en roedores afirman que la saciedad y el aumento del gasto de energía inducido por la leptina, se deben en parte a la reducción de la expresión hipotalámica de NPY, mientras que bajos niveles de leptina hacen incrementar la producción de NPY (Campfield y cols., 1996).

Más concretamente, se cree que la leptina puede actuar directamente en las neuronas hipotalámicas que sintetizan NPY, ya que en ellas se ha encontrado el receptor específico al que se une (OB-Rb) (Mercer y cols., 1996).

El hipotálamo es la región implicada en la regulación central del hambre (Tomaszuk y cols., 1996). En diversas zonas del mismo (núcleo paraventricular, núcleo arcuato e hipotálamo lateral o centro activador de la ingesta) se expresan tanto el receptor Y_1 como el Y_5 (Gerald y cols., 1996). Para determinar si dichos subtipos de receptores de NPY estaban implicados en la regulación del apetito, se utilizaron aproximaciones experimentales farmacológicas y genéticas. Algunos autores describieron varios análogos selectivos capaces de estimular el apetito (Gerald y cols., 1996; Hu y cols., 1996; Mullins y cols., 2001). Por otro lado, otros investigadores corroboraron su participación, puesto que el uso de antagonistas específicos de ambos, reducía la avidez que mostraban los animales de experimentación por los alimentos (Wieland y cols., 1998; Daniels y cols., 2001; Yokosuka y cols., 2001). Además, algunos experimentos, realizados *in vivo*, con animales que carecían de uno u otro receptor volvían a ratificar la implicación de ambos receptores (Marsh y cols., 1998; Pedrazzini y cols., 1998; Kanatani y cols., 2000b).

En resumen, se podría afirmar que el NPY regula la ingesta mediante la interacción de dos de sus receptores (Y_1 e Y_5) (Yokosuka y cols., 2001). Este hecho, convierte a los receptores de NPY en una diana farmacológica ideal para la posible síntesis de moléculas efectivas en la inhibición de la hiperfagia y de la obesidad inducida por el NPY.

Por otro lado, es interesante mencionar la creciente oleada de estudios que intentan relacionar la adicción al alcohol con el NPY. Aunque, actualmente no se conoce el mecanismo exacto por el que el consumo de alcohol induce adicción, se ha barajado la hipótesis de que pueda compartir los mecanismos hipotalámicos reguladores de la ingesta de alimentos (Clark y cols., 1998). Ciertos estudios han implicado al NPY en los efectos del etanol. Así, algunas investigaciones apuntan que la infusión de NPY en el hipotálamo aumenta la preferencia y el consumo de etanol (Kelley y cols., 2001). También se ha visto que los niveles de NPY están aumentados en ratas educadas para consumir alcohol (Hwang y cols., 1999), en ratas expuestas crónicamente a sus vapores (Ehlers y cols., 1998) o al consumo de una dieta rica (6%) en alcohol (Clark y cols.,

1998). Aparentemente, la implicación del NPY en el consumo de alcohol está mediado por los receptores Y_1 (Kelley y cols., 2001).

➤ **Efecto ansiolítico y sedante**

El NPY es capaz de regular la ansiedad (Britton y cols., 1997). De hecho, se demostró que ciertos fármacos prescritos en el tratamiento de algunos desórdenes afectivos (depresión, esquizofrenia, etc.), tales como el litio y los inhibidores de la recaptación de serotonina, aumentan los niveles de NPY. Por el contrario, dichos niveles se encontraban disminuidos en pacientes con ansiedad o depresión (Widerlöv y cols., 1988; Widdowson y cols., 1992).

Los efectos ansiolíticos que ejerce el NPY en diversos modelos experimentales, son comparables a aquellos inducidos por las benzodiazepinas. El efecto está mediado por los receptores Y_1 , situados en el núcleo central de la amígdala (Wahlestedt y cols., 1993; Sajdyk y cols., 1999), y por la reducción de la hormona corticotropina (CRH), liberada generalmente en situaciones de estrés (Kask y cols., 1997). Asimismo, se ha asociado el efecto ansiolítico del NPY con los receptores de opioides puesto que su bloqueo, con naloxona, disminuye los efectos del NPY en la ingesta (Rudski y cols., 1996), en la memoria (Cleary y cols., 1994) y en la ansiedad (Britton y Southerland, 2001). Sin embargo, el efecto ansiolítico del NPY no se ve afectado cuando se utiliza un antagonista de las benzodiazepinas (Britton y Southerland, 2001).

Por otro lado, algunos estudios demuestran que la administración de NPY reduce la actividad neuronal en ciertas zonas implicadas en la regulación del sueño (el *locus coeruleus* y en el rafe dorsal) (Grundemar y Hakanson, 1994). Por tanto, se puede decir que el NPY actúa como inductor del sueño (Ehlers y cols., 1997). En concreto, el tratamiento a voluntarios sanos con NPY reducía la secreción de la hormona adrenocorticotropa y del cortisol por bloqueo de los efectos de CRH (hormona liberada en situaciones de estrés), y aumentaba el período de sueño de la fase 2 y la fase REM (Antonijevic y cols., 2000).

Estos hallazgos, junto con el hecho de que el NPY se sintetiza en menor medida en pacientes con depresión (Widerlöv y cols., 1988), cuyos cuadros sintomáticos incluyen alteraciones del sueño, ansiedad y pérdida de apetito, sugieren el desarrollo de

nuevas estrategias terapéuticas, que incluyan a los agonistas de NPY en el tratamiento de los desórdenes afectivos.

➤ **Regulación del aprendizaje y la memoria**

Se ha demostrado que el NPY es capaz de producir un aumento de la memoria (Cleary y cols., 1994) e incluso, revertir la acción de algunos fármacos inductores de amnesia (Redrobe y cols., 1999). Sin embargo, según la zona donde sea administrado, el hipocampo o la amígdala, el NPY puede causar aumento de la memoria o amnesia, respectivamente (Redrobe y cols., 1999). Aparentemente, los receptores Y_2 son los implicados en esta función del NPY. Además, se ha sugerido que el NPY podría aumentar la memoria gracias a la inhibición de la liberación de GABA, neurotransmisor junto con el que se localiza (Aoki y Pickel, 1990).

Debido a sus efectos sobre la memoria (Thorsell y cols., 2000), se han estudiado los niveles de NPY en el cerebro de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Nilsson y cols., 2001), donde de nuevo, se han descrito niveles reducidos (Beal y cols., 1986) o niveles normales (Gabriel y cols., 1993; Gabriel y cols., 1996; Minthon y cols., 1997), en función de la zona del cerebro estudiada. No obstante, el factor neurotrófico derivado del cerebro, encargado de modular los niveles de neuropéptidos en el mismo, sí está disminuido en animales con la enfermedad de Alzheimer (Croll y cols., 1999).

➤ **Efectos analgésicos del NPY**

Algunos estudios han comprobado que la administración intratecal de NPY eleva el umbral del dolor (Munglani y cols., 1996). El mecanismo no se conoce por el momento, aunque parece ser que los receptores Y_1 están implicados en el proceso (Wang y cols., 2000). Se ha barajado la hipótesis de que el NPY, probablemente actúa como un inhibidor o modulador de la transmisión del dolor a través de la médula espinal. Dicha actuación podría ser directa sobre diversas áreas cerebrales relacionadas con el dolor (Polgár y cols., 1999), aunque también podría actuar indirectamente inhibiendo la liberación de la sustancia P, sustancia típicamente relacionada con el dolor (Duggan y cols., 1991).

1.3.3.2. EFECTOS PERIFÉRICOS DEL NPY

En el sistema nervioso periférico el NPY se encuentra en neuronas simpáticas, donde se localiza junto con NA, aunque también se ha encontrado en poblaciones de neuronas parasimpáticas (Michel y Rascher, 1995). Se han descrito diversos efectos periféricos del NPY tales como acciones en el sistema gastrointestinal, en el riñón (Chevendra y Weaver, 1992; Dibona y Sawin, 2001), en el páncreas (Lambeir y cols., 2001), en las glándulas tiroideas (Grunditz y cols., 1984), en las plaquetas (Nilsson y cols., 1996), en los mastocitos (Grundemar y Hakanson, 1991) y en el sistema cardiovascular (Allen y cols., 1986; Pheng y Regoli, 2000).

Debido a que la presente tesis doctoral se llevó a cabo en miocitos aislados de corazón de rata, en esta sección se dará una visión detallada de los efectos del NPY sobre el sistema cardiovascular.

1.3.3.3. EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL NPY

➤ Distribución del NPY en el sistema cardiovascular

El NPY es el péptido más abundante, tanto en el sistema arterial como en el miocardio. En el sistema nervioso periférico, se encuentra asociado a neuronas simpáticas y a algunas neuronas del tallo cerebral (neuronas aparentemente implicadas en el control del sistema cardiovascular) (Edvinsson y cols., 1987). Su distribución ha sido estudiada con técnicas de inmunoreactividad. Parece que su presencia es mayor en arterias musculares que en arterias elásticas, en pequeñas arterias más que en grandes arterias, siendo más abundante en arterias que en venas. A este respecto, se ha visto que el NPY se encuentra ampliamente distribuido en arterias coronarias de perro (Allen y cols., 1986), de rata (Gu y cols., 1984; Han y cols., 1989) y de hombre (Gu y cols., 1983), y alrededor de las fibras miocárdicas (Gu y cols., 1983), así como en los cardiomiocitos.

En el corazón, el NPY se encuentra mayoritariamente en las aurículas (Onuoha y cols., 1999). Así por ejemplo, en el corazón de perro, los ventrículos y el septum interventricular contienen cantidades moderadas del péptido (de alrededor de 45 y 28 pmol/g) mientras que se presenta en altas concentraciones en la zona del nodo aurículoventricular (Gu y cols., 1983; Gu y cols., 1984; Allen y cols., 1986). En el corazón de cobayo (Allen y cols., 1986) y de otras especies estudiadas, incluyendo el

hombre (Onuoha y cols., 1999), también aparece distribuido por todo el tejido cardíaco, siendo su presencia más destacable en la aurícula izquierda. En los ventrículos aparece en mayor concentración en el derecho que en el izquierdo (Onuoha y cols., 1999). Asimismo, la parte media del miocardio se encuentra más densamente inervada que el endocardio y que el epicardio (Gu y cols., 1984).

➤ **Efectos cardiovasculares a nivel central**

No se sabe mucho acerca de los efectos centrales del NPY sobre el sistema cardiovascular y sobre la respuesta simpática. Parece ser que dependen del lugar y de la vía de administración. Así, se ha visto que la microinyección de NPY, en el núcleo hipotalámico posterior, incrementa la presión arterial y la resistencia de algunos lechos vasculares y renales. Para ello, utiliza un mecanismo central, capaz de aumentar la liberación de NTs simpáticos. Sin embargo, la inyección de NPY en el tracto solitario induce la reducción de la misma (Michel y Rascher, 1995). Por su parte, un estudio reciente, realizado en conejos conscientes, señala que la administración intracerebroventricular disminuye la presión arterial, atenúa el control del baroreceptor de la actividad renal simpática y el rendimiento cardíaco (Matsumura y cols., 2000). Es más, este mismo estudio asegura que la leptina, molécula implicada en la saciedad y con efectos contrapuestos al NPY, está también implicada en el control del sistema cardiovascular, pues su administración inhibe todos los efectos del NPY a este nivel (Matsumura y cols., 2000).

➤ **Efectos periféricos del NPY en el sistema cardiovascular**

Efectos vasculares

En la periferia, el NPY modula la función cardiovascular actuando en la vasculatura, el corazón y el riñón (reduce el flujo renal y regula el efecto natriurético y diurético) (Bischoff y cols., 1994; Bichoff y cols., 2000). Las acciones típicamente atribuidas al NPY incluyen la regulación del tono vascular (Schuerch y cols., 1998) y el control de la función cardíaca.

En las neuronas presinápticas, el NPY inhibe su propia liberación y la liberación de catecolaminas de los nervios simpáticos (M_CDermott y cols., 1993). También es capaz de inhibir, mediante los receptores Y₂ (Abrahamsson, 2000; Smith-White y cols.,

2002), la estimulación vagal (es decir, la liberación de Ach) desencadenada como consecuencia de una activación simpática excesiva (Lundberg y cols., 1984; Awad y cols., 1991; Serone y Angus, 1999, Abrahamsson, 2000). La inhibición vagal podría funcionar como un “efecto de memoria” en estimulaciones simpáticas breves pero intensas, ya que prolonga el efecto simpático en el corazón.

Los efectos vasculares, a nivel postsináptico, se pueden dividir en efectos directos e indirectos (efectos de potenciación). Así por ejemplo, dentro de los efectos directos, destaca la capacidad del péptido para disminuir el flujo sanguíneo de las arterias coronarias (Allen y cols., 1986). Asimismo, el NPY actúa de forma notable en arterias cerebrales, mesentéricas y renales (para revisión, Michel y Rascher, 1995). En este sentido, su potente efecto vasoconstrictor se ha demostrado *in vivo*, en perros anestesiados (Awad y cols., 1991) e *in vitro*, en vasos aislados (Allen y cols., 1986; Pedrazzini y cols., 1998) y en tejidos (Franco-Cereceda y cols., 1985).

El efecto más destacado es a nivel de las pequeñas arterias coronarias (efecto asociado con el vasoespasmo coronario) (Edvinsson y cols., 1987; McDermott y cols., 1993). De hecho, la administración sistémica de NPY induce hipertensión debida al aumento en la resistencia vascular periférica (Hashim y cols., 1997). Acompañada, en la mayoría de los casos, de una bradicardia refleja, consecuencia de la elevada presión sanguínea y de la activación de los mecanismos del sinus carotídeo que inducen la disminución de la contractilidad (Lundberg y Tatemoto, 1982).

Aunque no es el efecto más común, en algunas circunstancias, el NPY causa vasodilatación. Normalmente, este efecto dual depende de la dosis y se ha descrito *in vivo*, secundaria a la liberación de histamina de los mastocitos o en la circulación cerebral, cuando las dosis son elevadas (Edvinsson y cols., 1987).

Otros estudios describen los efectos indirectos del péptido. Es decir, la potenciación de los efectos constrictores iniciados por otros agentes vasoconstrictores, (NA, histamina, angiotensina II, etc.). Estos efectos han sido estudiados en el conejo (Edvinsson y cols., 1984), en la rata (Wahlestedt y cols., 1990), en el hombre (Schuerch y cols., 1998) y en ratones transgénicos (Michalkiewicz y cols., 2001). De este modo, en algunos de los vasos periféricos donde el NPY no tiene un efecto directo claro, sí lo tiene en la presencia de otros agentes vasoconstrictores. Sin embargo, no se sabe si la potenciación de los efectos es dependiente o no del endotelio (McDermott y cols., 1993).

En general, los efectos inducidos por el NPY son similares a los producidos por la NA, con la diferencia de que los del péptido son menos pronunciados, pero más duraderos, ya que la degradación de la NA es mucho más rápida que la del NPY (Edvinsson y cols., 1987). El aclaramiento del NPY del plasma humano es de aproximadamente 20 min (Pernow y cols., 1987). Si bien, no faltan aquellos estudios, en el perro y el conejo, que excluyen la potenciación simpática o parasimpática, tradicionalmente atribuida al NPY (Awad y cols., 1991; Serone y cols., 1998).

Dada la multitud de efectos presinápticos descritos, es difícil predecir cómo influyen en una situación fisiológica, el efecto inhibitor presináptico y el efecto estimulador postsináptico, o cómo se relacionan entre sí la inhibición presináptica concomitante de los nervios simpáticos y parasimpáticos.

La vasoconstricción inducida por NPY es sensible a la acción de bloqueantes de los canales de Ca^{2+} (Haas y cols., 1991), lo que implica la participación del canal de Ca^{2+} tipo L en el proceso (Xiong y cols., 1993). En presencia del NPY, el Ca^{2+} que entra en la célula es incapaz de activar los canales de potasio activados por Ca^{2+} (Xiong y Cheung, 1994). Favoreciendo, por tanto, que la célula se encuentre excitada durante más tiempo, que el PA sea más largo y que en el interior de la célula la concentración de Ca^{2+} sea más elevada (Mihara y cols., 1989; Jacques y cols., 2000). Además de esta hipótesis para explicar los mecanismos que inducen los efectos vasoconstrictores del NPY, se han propuesto otras vías de actuación. Así, algunos estudios, realizados en células procedentes de aorta de cerdo, proponen que el efecto directo del NPY sobre los vasos está mediado por la fosforilación de la cadena ligera de miosina. También proponen que las interacciones del péptido con otros agentes vasoconstrictores pueden estar mediadas por efectos inhibidores de adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) y por la activación de la PKC (Lobaugh y Blackshear, 1990; Duckles y Buxton, 1994). Si bien, otros estudios describen una variación en el potencial de membrana (Prieto y cols., 1997), debido a la activación de canales iónicos inespecíficos y a la inhibición de la enzima A-C (Fredholm y cols., 1985; Prieto y cols., 1997).

Por su parte, el receptor implicado en el efecto constrictor del NPY es el Y_1 . Así lo demuestran algunos estudios realizados en ratones *knock out*, carentes del receptor Y_1 (Pedrazzini y cols., 1998), en conejos conscientes (Serone y Angus., 1999), en ratas, cobayos y conejos anestesiados (Abrahamsson, 2000) y en una investigación que

utilizaba oligodesoxinucleótidos específicos para el receptor Y_1 del hombre (Erlige y cols., 1993).

Otros estudios *in vitro*, realizados en distintos tipos celulares, corroboraban que tanto el aumento del Ca^{2+} intracelular como la consecuente activación de la cascada intracelular estaban mediados por el receptor Y_1 (Aakerlund y cols., 1990; Jacques y cols., 2000; Prieto y cols., 2000). Por el contrario, los efectos presinápticos del péptido parecen estar mediados por el receptor Y_2 , presente en el nervio vago y en las fibras nerviosas simpáticas (Shine y cols., 1994).

Efectos en el corazón

Aunque los efectos vasculares del NPY están bien documentados, los resultados de los estudios en corazón siguen siendo, aún, motivo de controversia entre los investigadores. Probablemente, el conflicto surge como consecuencia de las innumerables técnicas, especies y tejidos utilizados para el examen de la cuestión. Sin olvidar el hecho de que al describir los efectos del NPY sobre el corazón, a veces, no se pueden obviar ciertos efectos vasculares como la reducción del flujo sanguíneo coronario (Awad y cols., 1991) y el aumento de la resistencia vascular en varias especies, incluyendo al hombre (Allen y cols., 1983; Balasubramaniam y cols., 1988). De este modo, el NPY podría ejercer efectos en la post-carga como resultado de la vasoconstricción inducida en las arterias pero también podría modificar la pre-carga por la vasoconstricción causada en las venas.

En el corazón se han localizado al menos tres subtipos de receptores, el Y_1 (McDermott y cols., 1997), el Y_2 (McDermott y cols., 1997) y el receptor putativo Y_3 (Balasubramaniam y cols., 1990). Por tanto, es factible que el NPY module la función cardíaca directamente en los cardiomiocitos, alterando la contracción, el cronotropismo, la conducción eléctrica (Kralios y cols., 1995) o afectando la síntesis proteica que desencadenaría el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (Millar y cols., 1994).

Los efectos directos del NPY sobre la contracción son confusos y a menudo contradictorios, dependiendo de la especie y el tejido utilizado. En este sentido, se han descrito efectos inotrópicos negativos en estudios *in vivo* utilizando perros como animales de experimentación (Awad y cols., 1991). Este estudio concreto explicaba la reducción de la capacidad contráctil del corazón como la consecuencia de varios

fenómenos simultáneos; la vasoconstricción, inducida por el NPY, en las arterias coronarias, la activación refleja de los baroreceptores y la inhibición presináptica de la liberación de NTs de los nervios simpáticos, reduciendo por tanto, la actividad simpática.

Algunos autores decidieron realizar sus trabajos en tejidos aislados, evitando así los efectos que dan lugar a resultados contradictorios, como la perfusión miocárdica o la isquemia causada por el fuerte efecto vasoconstrictor del NPY. De nuevo, muchos de ellos obtuvieron resultados similares con respecto a la contracción. Así, el estudio de los miocitos de la rata (Balasubramaniam y cols., 1988; Piper y cols., 1989; Millar y cols., 1991), el cobayo (Bryant y cols., 1991) y el perro (Rigel y cols., 1989), dieron como resultado efectos inotrópicos negativos en la contracción. Por su parte, otros estudios, que intentaron analizar parámetros implicados en el mecanismo de la contracción, mostraron que el NPY inhibía la acumulación de AMP_C, previamente estimulada por forskolina o isoproterenol (ISO) y que prevenía su acumulación cuando el péptido se administraba previamente (Kassis y cols., 1987; Millar y cols., 1988). Estos datos sustentaban la hipótesis de Woo y Ganguly (1995) quienes afirmaban que el NPY era capaz de inhibir la contracción porque evitaba la estimulación contráctil inducida por otros agentes. Otras investigaciones llevadas a cabo en miocitos ventriculares de cobayo por Bryant y cols. (1991, 1996), desde una orientación metodológica distinta, verificaron de nuevo el comportamiento del NPY como inhibidor de la respuesta contráctil y como sustancia antiadrenérgica. Así, se demostró que el NPY era capaz de acortar el PA (Bryant y cols., 1991) y de disminuir la I_{CaL} (Bryant y Hart, 1996).

Por el contrario, otra corriente de investigadores apoya la hipótesis de que el NPY no ejerce ningún efecto sobre la contractilidad cardíaca. Así lo demuestran algunos estudios llevados a cabo en aurícula derecha (Allen y cols., 1986), en aurícula izquierda de cobayo (Wahlestedt y cols., 1987; Serone y Angus, 1999), en miocardio aislado de corazón de rata (Woo y Ganguly, 1995) y en células ventriculares de rata (Horike y cols., 1997).

De igual forma, se han descrito efectos inotrópicos positivos en perros vagotomizados (Hashim y cols., 1997), en aurícula de cobayo (Lundberg y cols., 1984; Franco-Cereceda y cols., 1985), en miocitos ventriculares de rata, donde la I_{to} era bloqueada previamente y en células ventriculares de cobayo (Millar y cols., 1991). De hecho, Millar y cols. (1991) argumentan que el efecto contráctil negativo del NPY, visto

anteriormente por su grupo (Millar y cols., 1988; Piper y cols., 1989), era debido, fundamentalmente, al aumento inducido por el NPY sobre la I_{to} . Sin embargo, el bloqueo de la misma con 4-AP desenmascaraba, por un lado, el aumento de la I_{CaL} y por otro lado, un efecto contráctil positivo. Además, la hipótesis se ratificaba porque en el corazón de cobayo, carente de I_{to} , el efecto era de nuevo inotrópico positivo. En este estudio, el efecto del NPY, en presencia de 4-AP, no se inhibía por la toxina pertussis (PTX), lo que implica otro mecanismo de acción alternativo.

Con respecto a la regulación del efecto cronotrópico tampoco existe acuerdo. A nivel postsináptico, algunos autores encuentran efectos positivos (Lundberg y cols., 1984; Franco-Cereceda y cols., 1987), mientras que otros no describen efecto alguno (Allen y cols., 1986; Rigel, 1988). Sin embargo, el NPY puede ejercer efectos presinápticos en el cronotropismo, inhibiendo las acciones tanto de la liberación de NA como de Ach. Por tanto, dependiendo de quién predomine, si el sistema simpático o el parasimpático, así será el efecto.

En contraste con la controversia establecida a la hora de concretar el efecto directo del NPY sobre el corazón, se sabe con seguridad que éste reduce el rendimiento cardíaco (McDermott y cols., 1993) y en el proceso, probablemente estén involucrados tanto los efectos cardíacos como los vasculares, expuestos anteriormente.

Los mecanismos moleculares que median los efectos del NPY en el corazón no están bien establecidos. Se sabe, como se mencionó en apartados anteriores, que el NPY actúa por medio de su unión a receptores específicos, de los que se conocen 3 subtipos distintos en el corazón; Y_1 , Y_2 , Y_3 . Los subtipos más abundante en el corazón son el Y_1 y el Y_2 (Balasubramaniam y cols., 1990; McDermott y cols., 1997).

Así, la controversia no se establece sólo en las acciones y efectos del NPY sobre la contractilidad del corazón sino también, en el mecanismo de acción del mismo. Aunque este no se conoce con exactitud, muchos investigadores postulan la inhibición de la enzima A-C (previamente estimulada con ISO) mediante el acoplamiento del receptor de NPY a proteínas G_i , sensibles a PTX (Kassis y cols., 1987; Millar y cols., 1988; Piper y cols., 1989; Bryant y cols., 1991; Millar y cols., 1991; Bryant y Hart, 1996). Este mecanismo podría explicar el efecto inotrópico negativo descrito por diversos autores (Awad y cols., 1991; Millar y cols., 1991).

Otro mecanismo de acción, propone la activación, por parte del NPY, de la vía del IP₃ y la estimulación de la PKC (Bell y cols., 1997), activando secundariamente la movilización de Ca²⁺ intracelular y la activación de los canales de Ca²⁺. Si este mecanismo resultara cierto, explicaría el efecto inotrópico positivo.

➤ **Implicaciones patológicas del NPY en el sistema cardiovascular**

El NPY, como se ha explicado anteriormente, tiene un potente efecto vasoconstrictor, hecho que conlleva un aumento de la presión arterial media. Este efecto es menos potente pero más duradero que el de la NA. Aunque dada su acción más lenta, las diferencias en cuanto a la potencia pueden ser sólo aparentes. Sin embargo, no está claro si en situaciones fisiológicas tiene alguna importancia, ya que su concentración plasmática es mínima en el hombre, teniendo valores aproximados de 10-20 pmoles/L (aunque las concentraciones sanguíneas difieren enormemente de unos pacientes a otros) (Onuoha y cols., 2000). El efecto, quizás, sería en situaciones fisiológicas que impliquen un aumento del tono simpático, como por ejemplo el ejercicio físico donde hay un aumento de los niveles plasmáticos de hasta cuatro veces los valores normales (Morris y cols., 1997; Gullestad y cols., 2000; Morgan y cols., 2000). Por el contrario, el NPY en situaciones patológicas sí puede desempeñar alguna función, puesto que también se ha visto que sus niveles están incrementados en situaciones de anoxia (Haass y cols., 1992) y de enfermedades vasculares como la hipertensión (Michel y Rascher, 1995), la angina de pecho (Onuoha y cols., 2000), el infarto de miocardio (Han y cols., 1989; Halawa y Salomon, 2001) o la insuficiencia cardíaca (Hulting y cols., 1990; Feng y cols., 1999).

Las razones de este incremento no se conocen por el momento, aunque podrían estar relacionadas con la alteración del control neurohumoral, generado con el fin de preservar niveles normales de presión arterial. Entre dichas alteraciones se incluye la activación del sistema nervioso simpático, en situaciones de estrés cardíaco (como la hipertrofia ventricular izquierda), lo que podría explicar en parte la depleción (Love y cols., 1993; Böhm y cols., 1995) y vaciamiento de los reservorios ventriculares y el aumento concomitante de las concentraciones en sangre tanto de NPY como de NA. De hecho, ratas a las que se inducía un infarto de miocardio, por ligadura de la arteria coronaria izquierda, liberaban más NPY en las zonas dañadas, circunstancia que podría

contribuir al aumento del flujo sanguíneo colateral induciendo procesos deletéreos en dicha zona (Han y cols., 1989). Sin embargo, algunos estudios apuntan que la deplección de los reservorios de NPY no es dependiente de la hipertrofia o de la hipertensión (Nyquist-Battie y cols., 1998).

Es curioso porque en estos casos (donde el tono simpático está activado) no existe correlación en los niveles plasmáticos de ambas sustancias en sangre. Circunstancia que se puede deber a que las vidas medias de ambas sustancias son diferentes (20 minutos para el NPY y 1 ó 2 minutos para la NA) (Pernow y cols., 1987).

En estados moderados de insuficiencia cardíaca la sensibilidad de los receptores al NPY está incrementada. Este hecho puede contribuir al mantenimiento de la precarga por vasoconstricción venosa (Feng y cols., 2000). Sin embargo, en estados avanzados de hipertrofia y en insuficiencia cardíaca, los receptores vasculares disminuyen su sensibilidad de respuesta al NA y al NPY (Feng y cols., 1999). El tratamiento con antihipertensivos, a dosis bajas que no normalizan la presión arterial, es capaz de revertir la desensibilización de los receptores (Böhm y cols., 1995). Por ello, se han propuesto algunos antagonistas y análogos como posible tratamiento alternativo a la hipertensión. Es el caso del NPY (27-36)-D, que ha demostrado efectos hipotensores en la rata (Roscoe y cols., 1996). Otros factores que pueden intervenir en la sensibilidad de los receptores al NPY son el sexo (Bischoff y cols., 2000) y la edad (Lambert y cols., 1999).

Es importante tener en consideración que el NPY también regula la acción vasoconstrictora de otros NT como por ejemplo la NA. Así, en algunos casos de angina o infarto de miocardio asociados con vasoespasmo, los pacientes podrían presentar resistencia a algunos tratamientos con bloqueantes α -adrenérgicos debido a la presencia de otros péptidos vasoactivos que siguen actuando (Allen y cols., 1986).

Se baraja la posibilidad de que pequeñas concentraciones de NPY no sean fisiológicas o patológicamente relevantes. No obstante, es posible que la exposición continuada a niveles bajos del péptido altere la sensibilidad celular a otros estímulos. Esta hipótesis resulta interesante porque los niveles del péptido están aumentados en enfermedades cardiovasculares. A este respecto, se ha mostrado que miocitos neonatales sometidos a bajas concentraciones de NPY variaban la respuesta de cronotrópica positiva a negativa de los agonistas α -adrenérgicos. Estos resultados sugieren, por tanto,

que el NPY puede alterar la diferenciación fenotípica de las células miocárdicas neonatales, contribuyendo a su maduración (Sun y cols., 1991; Sun y cols., 1998b). Esta hipótesis concuerda, perfectamente, con las observaciones realizadas, por otros autores, en miocitos adultos (Millar y cols., 1994; Goldberg y cols., 1998; Pellieux y cols., 2000). Así, se propone que el contacto continuado de las células con el NPY retarda la degradación de las proteínas y estimula su síntesis. A este respecto, un estudio de Goldberg y cols. (1998) propone que el NPY estimula la síntesis de proteínas de los miocitos adultos, mediante la activación de proteínas G sensibles a PTX y de la enzima fosfatidil inositol 3 kinasa (factor crucial para la síntesis proteica). Además, induce la activación de enzimas fetales como la isoenzima creatina kinasa-BB fetal, por la activación de la PKC y de la MAPK. Estos hallazgos junto con otros factores de crecimiento podrían ser los responsables del crecimiento patológico de las células, en pacientes con enfermedades donde los niveles plasmáticos del péptido están anormalmente elevados.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde el aislamiento del NPY en 1982 (Tatemoto y cols., 1982), muchos investigadores han estudiado sus efectos a todos los niveles del organismo. Sin embargo, resultaba especialmente interesante el estudio de las acciones y mecanismos implicados en la función cardiovascular, ya que a pesar de que su nombre haga referencia al sistema nervioso, es un péptido muy abundante en el corazón. Además, en él se han localizado al menos tres subtipos de receptores, el Y₁ (M_CDermott y cols., 1997), el Y₂ (M_CDermott y cols., 1997) y el receptor putativo Y₃ (Balasubramaniam y cols., 1990). Por tanto, era lógico pensar que el NPY modulara la función cardíaca directamente en los cardiomiocitos, alterando la contracción, el cronotropismo, la conducción eléctrica (Kralios y cols., 1995) o afectando la síntesis proteica que desencadenaría el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (Millar y cols., 1994).

Sin embargo, los investigadores no se ponían de acuerdo en cuanto al efecto del NPY en conceptos clave en el corazón, como la contracción. Por un lado, no era fácil aunar los efectos vistos por unos y otros autores debido a la diversidad de tejidos y especies utilizados y por otro lado, resultaba difícil separar los efectos meramente cardíacos de los efectos vasculares.

En este sentido, se han descrito efectos inotrópicos negativos en estudios *in vivo* utilizando perros, como animales de experimentación (Awad y cols., 1991), en miocitos de rata (Balasubramaniam y cols., 1988; Piper y cols., 1989; Millar y cols., 1991) en miocitos de cobayo (Bryant y cols., 1991) y de perro (Rigel y cols., 1989). Por su parte, otros estudios, que intentaron analizar parámetros implicados en el mecanismo de la contracción, mostraron que el NPY inhibía la acumulación de AMP_C, previamente estimulada por forskolina o isoproterenol (ISO) y que prevenía su acumulación, cuando el péptido se administraba previamente (Kasis y cols., 1987; Millar y cols., 1988).

Por el contrario, otra corriente de investigadores apoyaba la hipótesis de que el NPY no ejerce ningún efecto sobre la contractilidad cardíaca. Así lo demostraban algunos estudios llevados a cabo en aurícula derecha (Allen y cols., 1986), en aurícula izquierda de cobayo (Wahlestedt y cols., 1987; Serone y Angus, 1999), en miocardio aislado de corazón de rata (Woo y Ganguly, 1995) y en células ventriculares de rata (Horike y cols., 1997).

De igual forma, se han descrito efectos inotrópicos positivos en perros vagotomizados (Hashim y cols., 1997), en aurícula de cobayo (Lundberg y cols., 1984; Franco-Cereceda y cols., 1985), en miocitos ventriculares de rata, donde la I_{to} era bloqueada previamente y en células ventriculares de cobayo (Millar y cols., 1991).

Por otro lado, en la literatura aparecían pocos trabajos que describieran el efecto de NPY en las corrientes iónicas de membrana del corazón (Millar y cols., 1991; Bryant y Hart., 1996) o en la movilización de Ca^{2+} (Horike y cols., 1997), parámetros muy relacionados con la contracción.

Con respecto al mecanismo de acción, los resultados no eran mucho más unánimes. La idea más aceptada sobre el mecanismo de acción del péptido argumentaba la inhibición de la enzima A-C. Así, se especulaba que los receptores de NPY, anteriormente citados, están acoplados a proteínas G_i , sensibles a la toxina pertussis, que actúan disminuyendo o anulando la actividad de dicha enzima y por tanto, reduciendo los niveles de AMP_C intracelulares. La variación del contenido intracelular de AMP_C implica a su vez la modificación del flujo de Ca^{2+} , tanto mediante la modulación de los canales de Ca^{2+} , como por la movilización intracelular del mismo (Lundberg y cols., 1984; Mihara y cols., 1989). Otro mecanismo de acción propuesto, proponía la activación, por parte del NPY, de la vía del IP_3 , activando secundariamente la movilización de Ca^{2+} intracelular y la activación de los canales de Ca^{2+} .

El análisis profundo de la literatura que describe los efectos del NPY en el corazón demuestra que todavía quedan muchas incógnitas por resolver en relación a los efectos sobre las corrientes iónicas de membrana, la contracción y los mecanismos de acción implicados. Por ello, en un intento por esclarecer las acciones y mecanismos del NPY implicados en el corazón se decidió realizar una exhaustiva investigación en células ventriculares de rata, utilizando la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* y técnicas de fluorescencia acopladas a un microscopio confocal. Esta última permitiría el estudio simultáneo de la movilización de Ca^{2+} intracelular y de la contracción.

Por todo lo anterior, los objetivos que se plantearon en la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- 1.- Estudiar el efecto directo de NPY sobre la contracción y la señalización de Ca^{2+} intracelular, en miocitos ventriculares de rata.
- 2.- Analizar el subtipo de receptor y de los principales mecanismos de transducción implicados en el proceso de movilización Ca^{2+} intracelular.
- 3.- Estudiar el efecto de NPY sobre la I_{CaL} .
- 4.- Estudiar los subtipos de receptores implicados en el efecto de NPY sobre I_{CaL} .
- 5.- Investigar el efecto de NPY sobre la I_{to} .
- 6.- Estudio del subtipo de receptor y de los mecanismos de transducción que intervienen en el efecto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICA DE DISOCIACIÓN DE MIOCITOS CARDÍACOS DE RATA

3.1.1. FUNDAMENTO Y PUNTUALIZACIONES DE LA TÉCNICA

El aislamiento y obtención de células cardíacas, viables y tolerantes al Ca^{2+} , es fundamental para la correcta caracterización de las corrientes iónicas, implicadas en la función cardíaca. Por ello, es importante establecer, en cada laboratorio, una técnica de disociación fácilmente reproducible, que permita obtener miocitos con características fisiológicas similares.

La técnica utilizada para el aislamiento de células cardíacas consta básicamente de dos etapas. Durante la primera etapa, la separación de las células y la consecuente ruptura del tejido es de carácter enzimático, mientras que en la segunda etapa, la disgregación del tejido es de tipo mecánico.

Uno de los hechos más relevantes a tener en cuenta durante el proceso de disociación celular es la “**paradoja del calcio**” (Zimmerman y Hülsmann, 1966). En general, se ha visto que en la primera parte del proceso de disociación, es necesaria la exposición del corazón a una solución sin Ca^{2+} . Aunque las razones no se conocen con exactitud, parece ser que existen lugares específicos de unión para el Ca^{2+} en la membrana y/o matriz extracelular, hecho que favorece la integridad estructural del tejido. Por ello, la eliminación de dicho ion, del corazón, facilitará la posterior disgregación celular, ya que los discos intercalares se separan parcialmente entre si y parte del glicocáliz, que recubre la superficie del sarcolema se pierde (Frank y cols. 1982). Por tanto, después de la eliminación del Ca^{2+} , las células están mecánicamente desacopladas, fenómeno conocido con el nombre de disociación electromecánica. La limitación a esta aproximación experimental se basa en el daño irreversible que causa el Ca^{2+} sobre las células, cuando se las expone de nuevo al ion (paradoja del calcio) para restablecer las condiciones fisiológicas del miocito. Básicamente, se podría decir que cuando el corazón es expuesto de nuevo al Ca^{2+} , se produce una entrada masiva del mismo al interior de la célula y una consecuente activación de la contractilidad. Si a este hecho le sumamos el desacoplamiento mecánico existente entre las células, es lógico pensar que la fuerza local desarrollada por cada miocito se transmite sólo a pequeñas áreas, creándose entonces, demasiada tensión en esas zonas. A su vez y como consecuencia, se produce la hipercontractura de las miofibrillas y el daño estructural de

las mitocondrias. Como resultado, el sarcolema se rompe liberando proteínas y ATP de los reservorios celulares (para revisión Piper, 2000).

Por tanto, el ajuste de la concentración de Ca^{2+} durante cada etapa conllevará el éxito o el fracaso en la obtención de células viables y tolerantes al Ca^{2+} . Por ello, y teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, en la presente tesis doctoral se utilizaron concentraciones de Ca^{2+} crecientes que iban desde soluciones que no contenían el catión hasta soluciones que tenían una concentración de 1 mM del mismo.

La **temperatura** a la que se lleva a cabo la disociación celular es también un factor importante que influye dramáticamente en la obtención de miocitos viables. En general, el intervalo de temperatura, para la disociación de corazones de mamíferos, ha de ser de 35 a 37° C, aproximadamente (aunque una vez que las células se han obtenido pueden mantenerse a cualquier temperatura). Parece ser, aunque no se conoce el mecanismo con exactitud, que su importancia radica en la severa dependencia del RS a la temperatura, a la hora de captar el Ca^{2+} (Sreter, 1969).

3.1.2. SOLUCIONES

- **Solución Tyrode en mM:** NaCl 140; KCl 5,4; NaH_2PO_4 0,4; MgCl_2 0,5; Hepes 25; NaHCO_3 5; Glucosa 22; Insulina 0,1 μL ; el pH se ajustó a 7,4 con NaOH.
- **Solución con EGTA:** La composición de esta solución fue igual a la anterior excepto en que se añadió EGTA a una concentración de 0,2 mM.
- **Solución enzimática I:** El enzima, colagenasa Worthington tipo II (254 UI/mL) se disolvió en la solución Tyrode y se añadió CaCl_2 a una concentración de 0,1 mM.
- **Solución enzimática II:** La composición de esta solución es básicamente igual que la anterior excepto que se añadió 1mg de albúmina por cada mL de “solución enzimática I”.
- **Solución de lavado:** Se disolvieron 0,5 mM de CaCl_2 y 2 mg/mL de albúmina en la solución Tyrode.
- **Solución de almacenamiento:** En la solución Tyrode se añadió CaCl_2 (1 mM) y 2 mg/mL de albúmina.

3.1.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La técnica de obtención de miocitos cardíacos llevada a cabo en la presente tesis doctoral se basa en el método descrito anteriormente por Cheng y cols. (1993).

Los corazones se obtuvieron de ratas macho, de raza Wistar, con pesos comprendidos entre 250 y 260 g. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/mL) siguiendo la normativa europea. A continuación, se procedió a la extracción rápida del corazón que se mantuvo en la “solución Tyrode”, a baja temperatura (4°C), mientras se procedía al aislamiento de la aorta y se limpiaba de restos de sangre y grasa. Posteriormente, se montó en un aparato de Langendorff que mantenía una temperatura constante de 36° C. Seguidamente, se realizó la perfusión retrógrada a través de la aorta, con la “solución con EGTA”, atemperada a 37° C. Al corazón se le pasó esta solución con el fin de eliminar los restos de sangre y Ca^{2+} y terminar así con los latidos espontáneos del mismo. Una vez que el corazón estuvo limpio, es decir, cuando cambió de color (de rojo a marrón) y cuando la gota que pasaba a su través era traslúcida, se perfundió con la “solución enzimática I”. Cuando el corazón estuvo disociado la velocidad de caída de la gota aumentó (1,5 gotas por segundo).

Concluida la disociación de tipo enzimático, se dio paso a la disociación de tipo mecánico. Se quitó el corazón del aparato de Langendorff y se diseccionó en 4 partes anatómicas: ápex, septum, ventrículo derecho y ventrículo izquierdo. Las distintas partes del corazón se trocearon con ayuda de unas tijeras, y se pusieron en contacto con la “solución enzimática II”, sometiénolas a agitación durante 1, 2 y 3 min (para obtener fracciones a distintos tiempos), después de los cuales el sobrenadante se filtró, para separar las células de los trozos de tejido y se centrifugó durante 3 minutos, para favorecer el depósito de las mismas. Dichos depósitos se dispersaron en la “solución de lavado” con el fin de frenar la actividad enzimática sobre las membranas de las células y se volvieron a centrifugar. Por último, los depósitos celulares se resuspendieron en la “solución de almacenamiento” donde se conservaron hasta el momento de la experimentación.

Con este procedimiento se obtienen un 80% de células tolerantes al Ca^{2+} , las cuales son viables, incluso 48 horas después de la disociación (Bénitah y Vassort, 1999).

3.2. TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA

En la naturaleza existen ciertas moléculas que poseen propiedades fluorescentes, es decir, que absorben fotones y a continuación, son capaces de emitir luz. Generalmente, son sustancias con estructuras poliaromáticas o heterocíclicas a las que se denomina fluoróforos. Estas moléculas se caracterizan por presentar, en su estructura, enlaces o conjuntos de enlaces responsables de la absorción de luz. El estudio de la fluorescencia proporciona una valiosa información sobre aspectos estructurales de la molécula responsable, o de su relación con el medio que la rodea. En el ámbito biofísico el uso de estas técnicas permite observar, y en algunos casos cuantificar, sustancias o regiones biológicas concretas, por la mera unión de la sustancia o región objeto de estudio con la molécula fluorescente.

3.2.1. DESCRIPCIÓN DEL FENÓMENO DE FLUORESCENCIA

La fluorescencia tiene lugar como resultado de un proceso que consta de tres etapas: excitación, pérdida de energía y emisión. Durante la etapa de excitación, la molécula absorbe un fotón procedente de una fuente externa (una lámpara incandescente o un láser, por ejemplo), y como consecuencia, la molécula pasa desde el estado fundamental a un nivel energético superior o estado excitado (etapa 1 en la figura 15). Una vez en el estado excitado los rápidos procesos de relajación hacen que el sistema evolucione hacia un modo vibracional de menor energía del estado excitado. De esta manera, se disipa una determinada energía en forma de calor, etapa de pérdida de energía (fase 2 en la figura 15). Posteriormente, la molécula tiende a pasar de nuevo al estado fundamental. Este retorno se puede llevar a cabo de múltiples formas, las cuales compiten entre sí y se denominan, en su conjunto, procesos de desexcitación. En el caso de un fluoróforo, la vuelta al estado fundamental se realizará mediante la emisión de energía en forma de luz (fase 3 de la figura 15). Dado que durante el proceso hay una pérdida de energía (fase 2 en la figura 15) el fotón emitido tiene menor energía que el fotón absorbido. Como consecuencia, la longitud de onda del fotón emitido es mayor (τ_{Em}) que aquella del fotón absorbido (τ_{Ex}). La emisión fluorescente está, por ello, desplazada hacia el rojo, con respecto a la luz absorbida. Este principio general se conoce con el nombre de “Ley de Stokes”, o del desplazamiento hacia el rojo del espectro de emisión en relación con el de excitación. Por tanto, la diferencia en las

energías o longitudes de onda proporciona sensibilidad a las técnicas de fluorescencia, pues permitirá la detección selectiva de la longitud de onda de emisión aislada de la longitud de onda de excitación (figura 16).

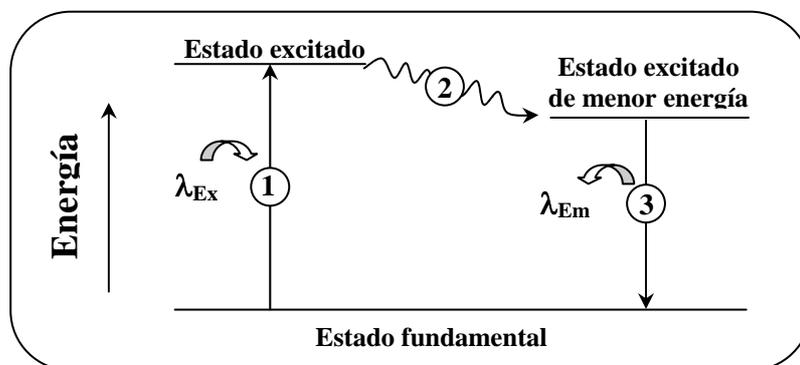


Figura 15. Diagrama Jablonski. La gráfica ilustra el proceso implicado en la creación de un estado electrónico excitado por absorción óptica y consecuente emisión fluorescente. 1. Excitación. 2. Paso al estado excitado de menor energía. 3. Emisión de fluorescencia.

3.2.2. ESPECTROS FLUORESCENTES

En general, la muestra fluorescente se suele iluminar con una luz monocromática, y que por tanto, sólo produce la transición a un modo vibracional concreto del estado excitado. Sin embargo, el retorno puede llevar a distintos modos vibracionales del estado fundamental. Como consecuencia, en un conjunto de moléculas que posean un fluoróforo determinado, aunque todas se exciten con una misma longitud de onda, los fotones pueden ser emitidos a distintas longitudes de onda. Es decir, aparecerá un “espectro de emisión fluorescente”. Dicho espectro representa la intensidad de fluorescencia emitida a las distintas longitudes de onda (figura 16). Por otro lado, el espectro de excitación será la representación de la intensidad de fluorescencia (para una sola longitud de onda de emisión) frente a diversas longitudes de onda de excitación. En general el espectro de emisión es una imagen especular del de excitación, pero desplazado hacia longitudes de onda mayores (desplazado, por tanto, hacia el rojo).

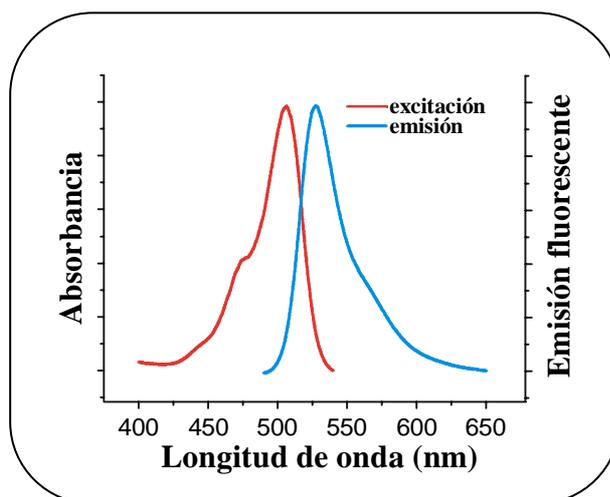


Figura 16: Espectro fluorescente del fluo-3.

3.2.3. DETECCIÓN FLUORESCENTE

Son cuatro los elementos requeridos para la detección de fluorescencia. En primer lugar, hará falta una fuente de luz, la lámpara, para provocar la excitación de la muestra. En general, la fuente más idónea será aquella capaz de emitir luz a una sola longitud de onda (el láser, por ejemplo). Es necesaria, también, la presencia de un fluoróforo, filtros para aislar los fotones de emisión de los de excitación y por último, un detector que registre la emisión y la transforme en una señal eléctrica, que puede ser representada por una imagen fotográfica.

Existen cuatro tipos de equipos de fluorescencia. Cada uno permite obtener una información distinta de la muestra que se analiza. Así por ejemplo, un espectrofluorímetro mide propiedades de masa de las muestras. El microscopio de fluorescencia resuelve la fluorescencia como una función de coordenadas espaciales en dos o tres dimensiones para objetos microscópicos (menores de 0,1 mm de diámetro). Es el tipo de equipo utilizado en la presente Tesis Doctoral. Por su parte, el escáner de fluorescencia analiza la fluorescencia como una función de coordenadas espaciales en dos o tres dimensiones para objetos macroscópicos tales como, geles de electroforesis, cromatogramas, etc. Por último, el citómetro de flujo mide la fluorescencia en la propia célula. Las células pasan aisladas por un haz de luz gracias al flujo continuo al que están sometidas.

3.2.3.1. FLUORÓFOROS

La naturaleza de estas sustancias es, en general, poliaromática o heterocíclica. Son, por tanto, moléculas que poseen enlaces o conjuntos de enlaces, capaces de absorber y emitir fotones. Las moléculas que presentan fluorescencia por sí mismas se denominan fluoróforos intrínsecos. Sin embargo, la mayoría de las moléculas o estructuras objeto de estudio, en el ámbito de la biomedicina, no son fluorescentes. Por ello, será necesaria la unión covalente o no con un fluoróforo ajeno a ellas de tal forma que adquieran la propiedad de emitir luz. Son los denominados fluoróforos extrínsecos.

Las propiedades que debe cumplir cualquier fluoróforo podrían resumirse, básicamente, en tres: 1) que sus espectros de absorción y emisión no se solapen, 2) que sean eficientes en la absorción y en la emisión. La eficiencia del fluoróforo se suele evaluar en función del coeficiente de extinción molar para la absorción y en función del rendimiento cuántico en el caso de la emisión. 3) que sean capaces de absorber luz y emitirla de forma repetida y cíclica.

A este respecto, es interesante recalcar que algunas veces las propiedades fluorescentes de las moléculas se pueden ver alteradas por causas externas a ellas. Por ejemplo, una intensidad lumínica demasiado elevada conlleva fenómenos irreversibles de fotoblanqueamiento y de desactivación (*quenching*) de fluorescencia (procesos donde la molécula emisora de luz pierde irreversiblemente sus propiedades, debido, principalmente, a la interacción con otras moléculas, desactivantes o *quenchers*, presentes en el medio). Otros factores como la polaridad del solvente utilizado, la concentración de sustancias desactivantes en la solución, el pH, e incluso la temperatura, también pueden modificar las propiedades fluorescentes de una molécula.

➤ **Medidas de calcio con indicadores fluorescentes**

En el caso concreto que nos ocupa, el ion estudiado, mediante técnicas fluorescentes, es el Ca^{2+} . Su investigación es posible gracias a la ingeniosa aproximación experimental que realizaron Grynkiewicz y cols., en el año 1985. Ellos fueron capaces de combinar magistralmente un fluoróforo con un quelante de Ca^{2+} , hecho que permitió la monitorización y el registro del Ca^{2+} intracelular en células vivas.

En la actualidad, se comercializan multitud de indicadores fluorescentes de calcio, que se pueden clasificar en función de criterios químicos. Es decir, si con ellos se

puede conocer o no la concentración intracelular de Ca^{2+} (ratiométricos o no ratiométricos, respectivamente). También se pueden clasificar en función de parámetros físicos. Entonces, se dividen según la longitud de onda a la que son excitados, UV o visible.

Fluo-3

Debido a que el presente estudio se llevó a cabo con el indicador fluorescente Fluo-3 merece la pena mencionar algunas de las propiedades que le caracterizan.

El fluo-3 fue desarrollado por Tsien, en el año 1989. El principal objetivo era conseguir un fluoróforo que se excitara a longitudes de onda del visible. Esta sustancia carece de propiedades fluorescentes cuando no está unida al Ca^{2+} y su rendimiento cuántico en saturación es aproximadamente 0,14. El espectro de emisión se fija normalmente en valores mayores de 525 nm mientras que el espectro de excitación suele ser 488 nm (figura 16).

En general, el fluo-3 se encuentra en forma de ester (acetometilester), lo que le permite atravesar las membranas fácilmente, e introducirse en el interior de las células. Una vez dentro, las esterasas presentes en el citoplasma romperán los enlaces tipo ester y por tanto dejarán libre al indicador fluorescente.

En el caso de que los experimentos de fluorescencia se acoplen a técnicas de patch-clamp, no será necesario que el fluo-3 se encuentre como ester, ya que se introducirá en el interior de la célula a través de la micropipeta. Para este tipo de ensayos, se utilizará la sal potásica de fluo-3.

3.2.4. EQUIPOS UTILIZADOS

3.2.4.1. DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA

El equipo utilizado consta de una lámpara de excitación de Xenon, que excita a las células, previamente cargadas con el indicador fluorescente, a una longitud de onda comprendida entre 460 y 490 nm. La luz emitida por la lámpara es procesada de forma selectiva por algunos filtros, que sólo permiten el paso del intervalo de longitudes de onda elegidas. El sistema también está dotado de un dispositivo denominado dicroico (figura 17). Su principal utilidad consiste en aislar longitudes de onda. Así, longitudes de onda de alta energía se reflejarán, mientras que longitudes de onda de baja energía lo atravesarán. De este modo, se podrá aislar fácilmente la luz de excitación (de baja longitud de onda y alta energía) de la luz de emisión (de mayor longitud de onda pero menor energía).

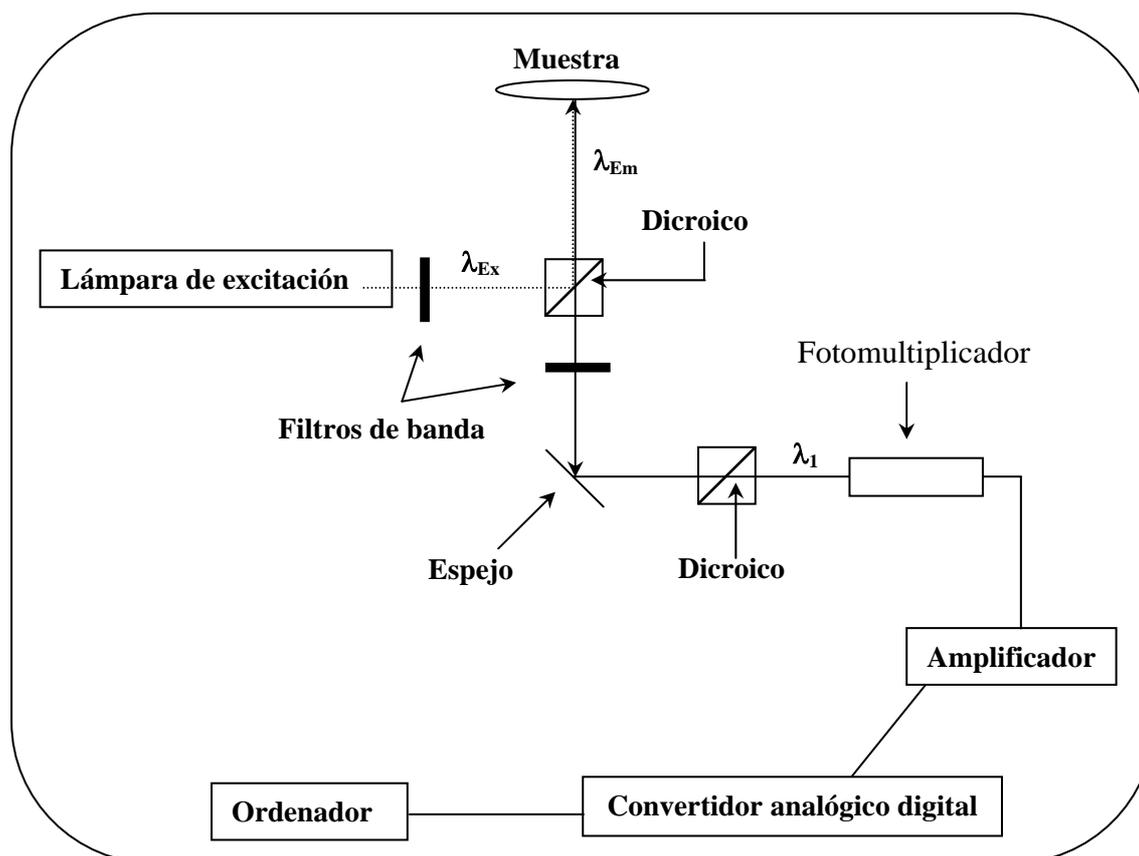


Figura 17. Esquema general de un microscopio de epifluorescencia

Las señales fluorescentes emitidas (mayores de 520 nm) son recogidas directamente en un tubo fotomultiplicador (Nikon France). La señal eléctrica, una vez amplificada y filtrada a 100 kHz (Filtro Fern Development), es transformada mediante un convertidor analógico digital (TL-1, Axon Instruments) conectado, a su vez, a un

ordenador. Finalmente, las señales digitales se registran, a una tasa de muestreo de 200 μ s, y se analizan usando el programa pclamp6 (figura 17).

3.2.4.2. DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO CONFOCAL

El microscopio convencional de epifluorescencia permite el registro del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo si lo que se quiere estudiar son las unidades elementales que constituyen el transiente, los *sparks*, entonces se requiere un sistema más sofisticado que proporcione una mayor resolución espacial. La ventaja que ofrece el microscopio confocal se basa en el hecho de que sólo registra la luz procedente del objeto situado en foco, a la vez que elimina el resto de fluorescencia que viene de áreas fuera de foco (figura 18).

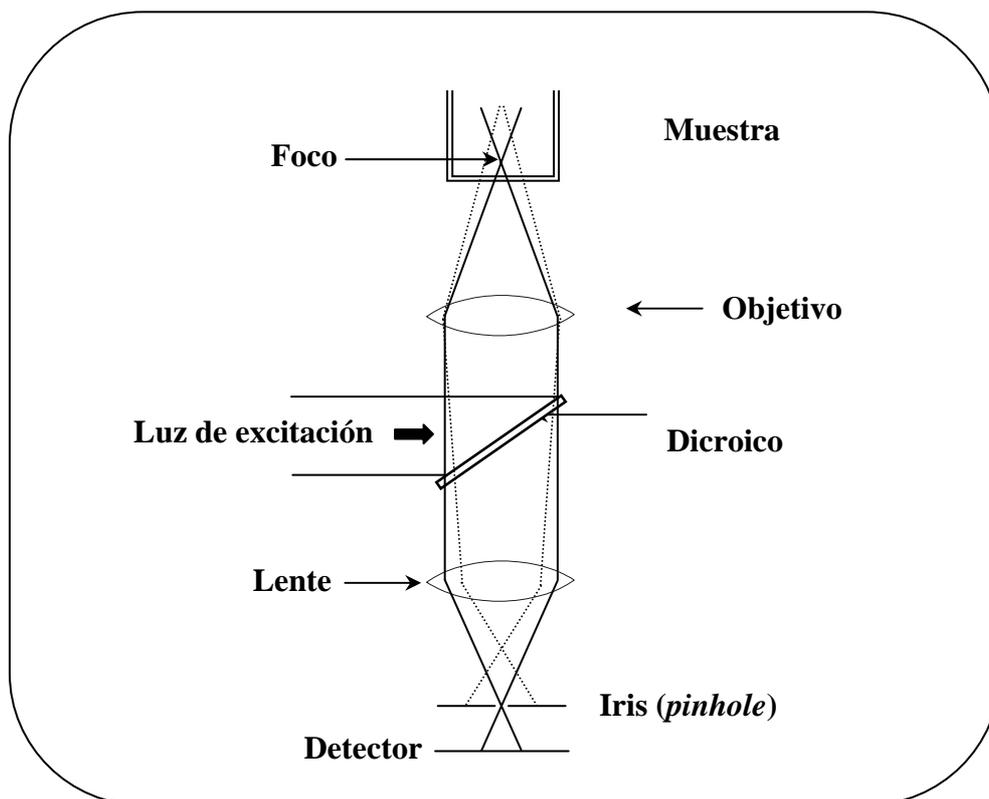


Figura 18. Esquema del fundamento para la detección fluorescente en un microscopio confocal.

El fundamento del microscopio confocal es, básicamente, el mismo al descrito anteriormente. Sin embargo, algunos de los componentes difieren en sus características. En primer lugar, la luz de excitación (lámpara láser) suele iluminar sólo el punto seleccionado. De este modo, se evitará el fenómeno de blanqueamiento sufrido por las

muestras cuando son excitadas varias veces, o a una intensidad lumínica muy elevada, y por otro lado, la región excitada se verá limitada por el punto de luz. En segundo lugar, la luz fluorescente emitida será conducida hacia un diafragma (*pinhole*) situado, con respecto a la muestra, en un punto óptico concreto. Esta particularidad del equipo supone una gran ventaja, ya que el resto de luz no procedente del plano focal, no podrá atravesar el estrecho iris y como consecuencia no será detectado (figura 18).

La imagen obtenida puede estar formada por líneas consecutivas del mismo fragmento de la muestra (una célula en el caso que nos ocupa) a distintos tiempos. Por ello, se dice que la imagen se obtiene mediante barrido de línea (figura 19). Así, una línea paralela al eje longitudinal de la célula, era escaneada, repetidas veces (cada 1,5 ms en el estudio de los *sparks* o 3 ms en el caso del estudio del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$) (figura 19).

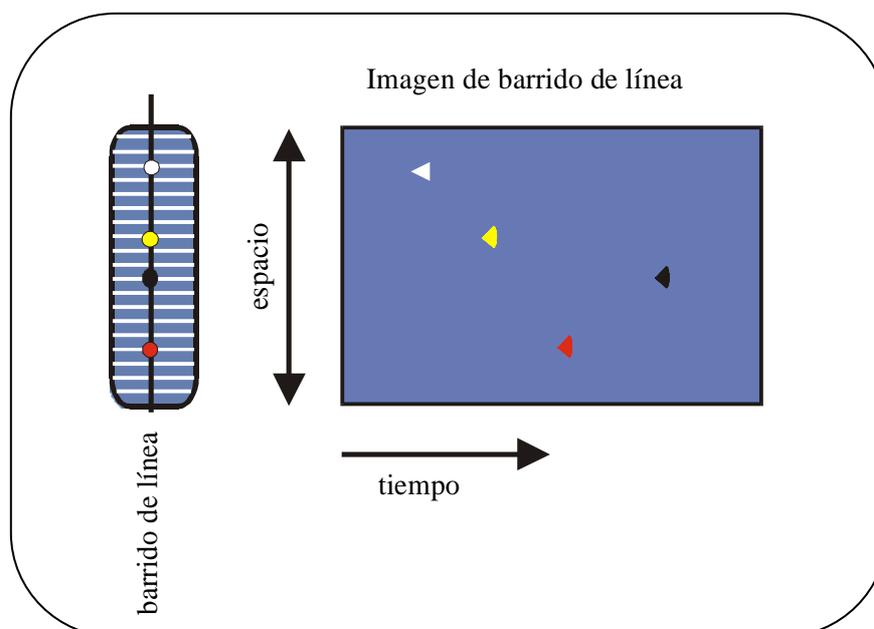


Figura 19. Esquema básico de la obtención de una imagen de *sparks* de Ca^{2+} en un microscopio confocal mediante barrido de línea.

Los registros del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ y de sus unidades elementales, los *sparks* obtenidas en el presente trabajo, se recogieron en un microscopio confocal (Zeiss LSM 510) acoplado a una lámpara láser de Argón, que excitó la muestra a 488 nm. El microscopio invertido (Axiovert 100M, Zeiss) constaba de un objetivo de inmersión de agua (x63 y 1,2 de apertura numérica) (C-Apochromat, Zeiss). La luz emitida fue recogida por un filtro que sólo permitía el paso de longitudes de onda mayores de 505 nm. Posteriormente, las imágenes obtenidas se procesaron y analizaron usando el software IDL (Research system. Boulder. CO).

3.2.5. SOLUCIONES Y PRODUCTOS QUÍMICOS

3.2.5.1. SOLUCIÓN DE REGISTRO

La solución de registro, utilizada para los registros de transientes de Ca^{2+} globales o locales, es muy similar al medio extracelular en condiciones normales. Su composición se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 2. Solución de registro utilizada en los experimentos de fluorescencia.	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	4
MgCl₂	1,1
HEPES	10
Glucosa	10
CaCl₂	1,8
pH = 7,4 (Ajustar con NaOH)	

3.2.6. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES: TRANSIENTES DE CALCIO

3.2.6.1. PREPARACIÓN Y CARGA DEL FLUO-3

Para introducir el fluoróforo en la célula es necesario variar la solubilidad del mismo. Por ello, se utilizó fluo-3 (Molecular Probes) en su forma esterificada (acetometilester). Gracias a la liposolubilidad de los ésteres, el marcador fluorescente atraviesa fácilmente la membrana celular. Una vez en el interior, las propias esterasas de la célula romperán los enlaces y el fluo-3 quedará libre

El fluo-3 se disolvió en una mezcla de ácido plurónico F-127 (1/4) y dimetilsulfóxido (3/4) (DMSO) para obtener una solución madre de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A continuación, se añadió a la suspensión celular, a una concentración final de 5 μM . Esta mezcla se mantuvo en oscuridad durante 40 minutos. Este tiempo es suficiente para que el fluo-3 atravesase las membranas celulares, para que se rompan los enlaces esteroídicos y se libere la forma activa. Transcurrido ese tiempo, las células se resuspendieron en una solución Tyrode sin fluo-3.

3.2.6.2. TRANSIENTE DE CALCIO GLOBAL

Para determinar los transientes de $[Ca^{2+}]_i$, de los miocitos cardíacos se utilizó la técnica de estimulación de campo (*field stimulation*). En primer lugar, se procedió a la carga de las células con el indicador fluorescente fluo-3 (tal y como se explicó en el apartado anterior). Posteriormente, una alícuota de células se depositó en una cámara de registro, situada en la platina de un microscopio de epifluorescencia o en la de un microscopio confocal. La cámara de registro tenía acoplada, en su interior, dos electrodos de platino situados en paralelo y conectados, a su vez, a un estimulador eléctrico, capaz de producir diferencias de potencial, en el espacio delimitado por los filamentos. Así, todas las células que quedaran entre ambos podían ser estimuladas. De este modo, se inducía la contracción de la célula. La contracción se produce por el fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). Por tanto, la intensidad de liberación del Ca^{2+} (transientes de $[Ca^{2+}]_i$) se puede medir por medio de la señal fluorescente emitida y registrada, posteriormente, por un equipo de epifluorescencia o un microscopio confocal.

Una vez seleccionada la célula, comenzó la perfusión con la solución de registro y se la estimuló con una corriente 1,5 veces el umbral de excitación, a 1 Hz de frecuencia. Al mismo tiempo, se excitó lumínicamente a la célula (a una longitud de onda de 488 nm) de modo que pudiera registrarse la señal fluorescente a la vez que la contracción.

Hay que puntualizar que los primeros estudios sobre el efecto de NPY y su efecto sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron en un microscopio de epifluorescencia. El objetivo era determinar de forma rápida si el NPY tenía algún efecto sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ y el tiempo al que dicho efecto era más marcado, en nuestras condiciones experimentales (ver la sección de resultados). Una vez establecida la concentración y el tiempo donde el efecto era máximo, el registro de los transientes se llevó a cabo en un microscopio confocal. Su uso se justifica por sus ventajas técnicas (ver apartado 3.2.4.2 de esta sección), porque permite el análisis de la contracción de la célula (parámetro que podía tener interés dados los resultados obtenidos de forma preliminar, ver resultados) y porque permitía también el estudio de las unidades fundamentales que constituyen el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, los *sparks*.

Con el microscopio de epifluorescencia se obtiene una señal eléctrica digitalizada posteriormente y registrada a una tasa de muestreo de 200 μ s con el programa pClamp6 (figura 20).

Sin embargo, con el microscopio confocal se obtiene una imagen de barrido (figura 21, A y B). Cada punto de la imagen corresponde con un valor arbitrario de intensidad lumínica. Por tanto, el negro tomará un valor de 0 y el blanco tomará el valor máximo, 255. De esta imagen se puede obtener el correspondiente transiente (figura 21A, panel inferior).

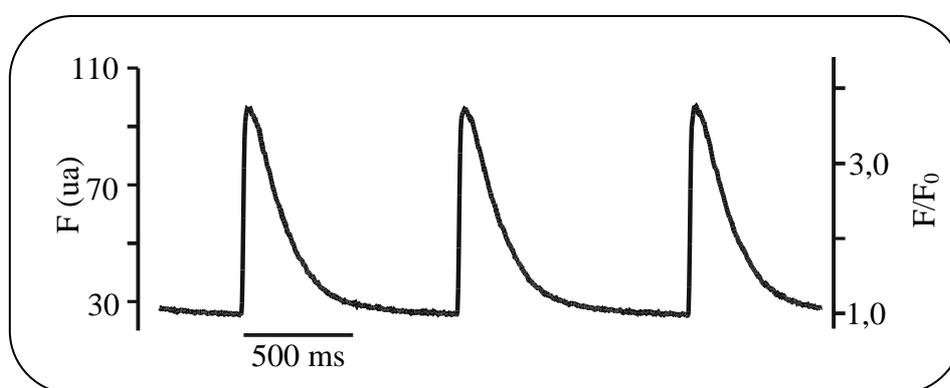


Figura 20. Ejemplo representativo de un transiente de $[Ca^{2+}]_i$ obtenido en el microscopio de epifluorescencia.

El transiente obtenido, tanto en el caso de los experimentos realizados en el microscopio de epifluorescencia como en el caso de los obtenidos en el microscopio confocal, se normalizó con respecto a la señal fluorescente obtenida antes de la despolarización, ya que se asume que la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo es la misma en todas las células.

Así, los valores de amplitud se midieron como el máximo valor de F/F_0 con respecto al tiempo, donde F es el valor de fluorescencia y F_0 es la fluorescencia basal, antes de inducir la despolarización (figura 21A). Por su parte, el constante de tiempo de relajación del transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (τ) se calculó ajustando la fase descendiente del trazo fluorescente a una exponencial simple (figura 21A, panel inferior).

3.2.6.3. TRANSIENTE DE CALCIO LOCAL

Los *sparks* de Ca^{2+} pueden definirse como las unidades elementales que conforman un transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En la presente investigación se estudiaron los *sparks* espontáneos de miocitos cardíacos de rata. En general, la liberación de *sparks* por parte del RyR se produce cuando hay una entrada local de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L (durante la fase 2 del PA). Por tanto, la probabilidad de apertura de los RyR depende de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, de tal forma que cuando ésta aumenta, la probabilidad de apertura también aumenta. Sin embargo, la probabilidad de apertura del RyR nunca es cero ya que tampoco es cero la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Aprovechando este hecho, se pueden aislar *sparks* de Ca^{2+} en el estado de reposo donde la probabilidad de apertura, aunque no muy favorable, no es nula, existiendo siempre un goteo de *sparks* a través del RyR.

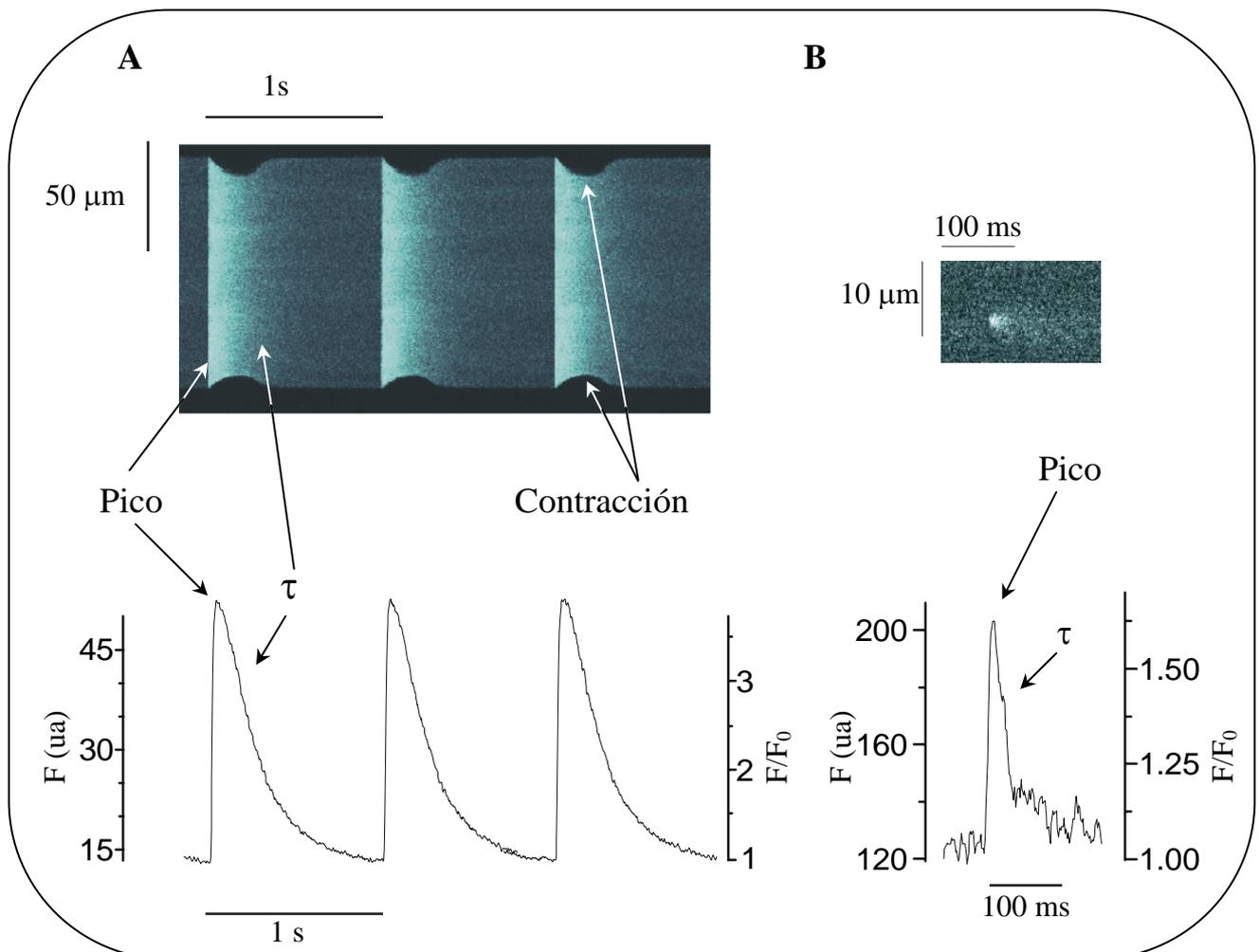


Figura 21. Ejemplos de imágenes de barrido de línea y transientes obtenidas en el microscopio confocal. **A.** Imagen de barrido de línea (panel superior) mostrando el transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenido durante la estimulación de una célula a 1 Hz de frecuencia. En el panel inferior se observa el transiente obtenido a partir de la imagen y los parámetros utilizados para su correcto análisis. **B.** Imagen de barrido de línea (panel superior) que muestra un *spark* espontáneo. En el panel inferior se observa el transiente obtenido a partir de la imagen y los parámetros utilizados para su correcto análisis.

Los *sparks*, al igual que los transientes son incrementos transitorios de Ca^{2+} . Por ello, se puede decir que poseen una amplitud máxima o pico y una zona de caída o curso temporal de relajación (τ) (figura 21B, panel inferior). Los factores que contribuyen en la cinética de relajación de los *sparks* de Ca^{2+} son distintos de los factores que influyen en el transiente global $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A diferencia de este último, en la constante de relajación de los *sparks* de Ca^{2+} influyen principalmente la difusión desde el lugar donde se origina hacia otras zonas donde la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es menor, y la SERCA (Gómez y cols., 1996). Por el contrario, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ no participa en el proceso porque su activación es mucho más lenta (Bassani y cols., 1994).

Las imágenes de los *sparks*, al igual que en el caso de los transientes globales se obtuvieron mediante el sistema de barrido de línea (figura 21B, panel superior). Así, un miocito era escaneado repetidas veces (cada 1,5 ms) a lo largo de una línea paralela al eje longitudinal de la célula. El transiente fluorescente (figura 21B, panel inferior), de cada *spark*, se obtuvo por el mismo procedimiento (citado en el apartado anterior) que en el caso de los transientes globales. Es decir, cada punto de la imagen tomó un valor arbitrario de intensidad lumínica, desde 0 (para el negro) hasta 255 (para el blanco) (figura 21B, panel inferior).

Los valores arbitrarios de fluorescencia (F) fueron también normalizados con respecto al valor de fluorescencia basal (F_0) para obtener un máximo valor de F/F_0 (pico del transiente) (figura 21B, panel inferior) También se analizó el tiempo de relajación del transiente local (τ). Para ello, se ajustó la fase descendiente del trazo fluorescente a una función exponencial simple (figura 21B, panel inferior). La anchura media o dispersión media espacial (en inglés, *half-width*) se midió a partir de un transiente transversal obtenido de los valores fluorescentes medios en 15 ms a lo largo del espacio y ajustado posteriormente a una función de Gauss (figura 21B, panel inferior).

3.3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS

3.3.1. TÉCNICA DE *PATCH-CLAMP*

La técnica de *patch-clamp* permite medir las propiedades eléctricas de células aisladas (potenciales de acción y corrientes eléctricas). En el caso concreto que nos ocupa, proporciona información sobre el comportamiento de las corrientes que pasan a través de ciertos canales iónicos.

La técnica se fundamenta en la capacidad conductora de las células cuando hay variaciones en el potencial de la membrana. De esta forma, cuando las células reciben un estímulo eléctrico son capaces de conducir corriente, pues la membrana facilita la entrada o la salida de iones. Por tanto, según lo anterior y según la ley de Ohm (la intensidad de corriente es proporcional al voltaje aplicado e inversamente proporcional a la resistencia que se oponga a dicho paso de corriente), si fijamos un voltaje determinado, podremos medir la corriente iónica que fluye a dicho potencial (*voltage-clamp*) o por el contrario, si fijamos un valor de corriente determinado (*current-clamp*) podremos analizar la variación de voltaje, es decir, se podrán estudiar potenciales de acción.

Para trasladar las conjeturas teóricas a aspectos prácticos, los investigadores Neher y Sakmann (premiados con el prestigioso premio Nobel) diseñaron, en 1978, un modelo experimental, modificado posteriormente por Hamill y cols. (1981), con el que se podían estudiar canales iónicos por primera vez (Neher y cols., 1978). La técnica consistía en la formación de un sello de alta resistencia (llamado por ello en el argot electrofisiológico anglosajón *giga-seal*), entre la célula y una micropipeta rellena de una solución electrolítica. A su vez, la pipeta estaba conectada a un amperímetro lo que permitía la fijación del voltaje, en la porción de membrana sellada. De este modo, se podían determinar las corrientes iónicas, puesto que además del voltaje, también se conocía la resistencia que oponía la pipeta al paso de la corriente, en la porción de la membrana donde se había formado el sello.

3.3.1.1. CONFIGURACIONES DE PATCH-CLAMP

A partir de estas primeras aproximaciones a la técnica, fueron surgiendo mejoras y modificaciones. Así, el registro de las corrientes de membrana se puede efectuar a partir de distintas configuraciones; *on-cell patch* (registro de la corriente sólo en la zona delimitada por el parche), *whole-cell* (registro de la corriente en toda la célula, la pipeta abre un orificio en la membrana), *perforated-patch* (registro de la corriente en toda la célula, la pipeta contiene un antibiótico capaz de abrir pequeños poros en la membrana), *inside-out* y *outside-out* (registro de la corriente de una vesícula previamente extraída de la membrana dejando el interior celular o el exterior en el lado externo de la pipeta, respectivamente). Las distintas configuraciones y el método de obtención de las mismas aparecen reflejados en la figura 22.

Llegados a este punto, es importante destacar que sea cual fuere la configuración utilizada siempre es necesaria la utilización de un electrodo de succión (con diámetro interno de punta aproximado de 2,5 μm), relleno de una solución conductora similar al líquido intracelular o al extracelular según convenga. Por supuesto, tanto en la solución intracelular como en la solución que baña el exterior de la célula se pueden añadir bloqueantes o moduladores farmacológicos, con el fin de aislar la corriente objeto de estudio.

Todas las configuraciones que se describirán a continuación convergen en los primeros pasos de ejecución, teniendo cada una de ellas pasos diferenciales concretos.

On-cell-patch o *cell-attached*

El primer paso para la obtención de la citada configuración consiste en aproximar la punta de la pipeta a la superficie de la membrana. Es conveniente que a la pipeta se le aplique una ligera presión positiva para evitar el intercambio iónico con la solución extracelular, y para evitar que se ensucie, lo que imposibilitaría la formación posterior del sello. A continuación, cuando la pipeta está próxima a la célula y la señal que se aprecia en el osciloscopio se vuelve ruidosa, se suprime la presión positiva y se aspira levemente hasta que hay una adhesión perfecta entre el exterior de la pipeta y la membrana de la célula. Se dice entonces que se ha formado un sello de alta resistencia o *giga-seal* (denominado así porque la resistencia obtenida es de 10 a 100 gigaohms). En este momento nos encontramos en la configuración de *cell-attached* (figura 22). Esta configuración sólo permite el estudio de las corrientes en la porción del “parche” de

membrana delimitada por los bordes de la pipeta. Es decir, se tiene la posibilidad de analizar corrientes unitarias, del canal o canales que se encuentran en el parche. El mayor inconveniente que presenta esta aproximación se basa en que no se puede conocer el potencial de la membrana celular en reposo, ni se puede modificar el medio intracelular, sólo se controla la solución que baña a la célula.

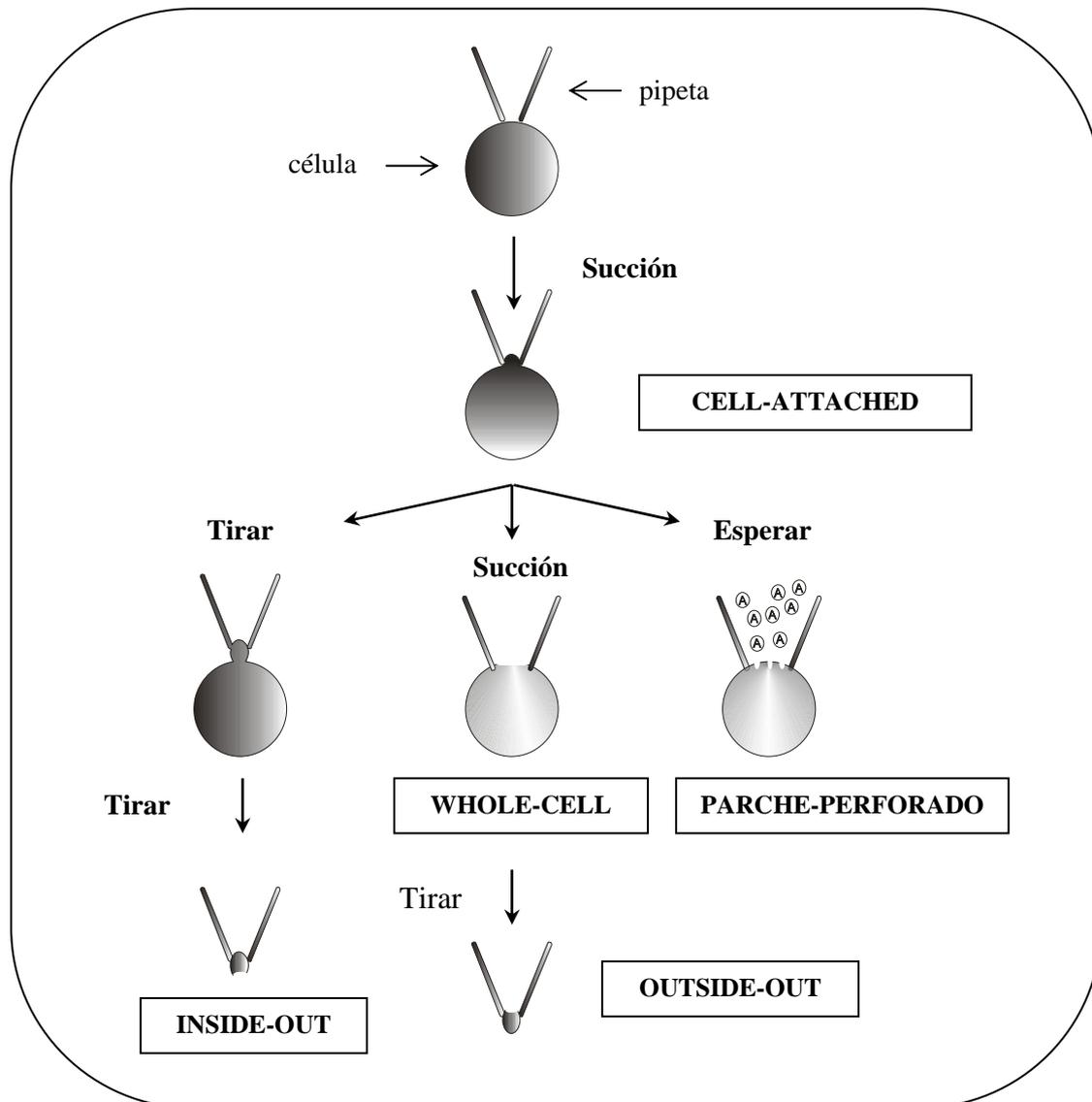


Fig. 22. Esquema de las configuraciones de la técnica de patch-clamp. (Modificado de Hamill y cols., 1981).

Configuración de célula entera o Whole-cell

En la configuración de *whole-cell* o célula entera el interior de la pipeta queda en contacto directo con el citoplasma, permitiendo estudiar la corriente que pasa a través de toda la membrana celular. Una vez alcanzada la configuración de *cell-attached* es

necesario aplicar una leve succión para conseguir que el sello se rompa y que el interior de la pipeta entre en contacto con el citoplasma (figura 22). De esta manera, se consigue que el acceso eléctrico tenga menos interferencias con el ruido eléctrico. Es importante destacar que la corriente registrada en este caso es la corriente que pasa a través de todos los canales de la membrana celular y por tanto, dicha corriente dependerá del número de canales, de la corriente unitaria y de la probabilidad de apertura de dichos canales en cada potencial, (es decir, de la ecuación de Nerst). Esta configuración permite el aislamiento de corrientes iónicas ya que es posible la modificación del medio extracelular e intracelular. Para ello, simplemente será necesario el uso de bloqueantes específicos del resto de los canales o bien la sustitución de los iones que no interesen por otros incapaces de atravesar la membrana celular.

Sin embargo, el método presenta algunos inconvenientes. El problema es la diferencia de volumen entre el contenido de la pipeta y el contenido celular. Es decir, el interior de la pipeta contiene una solución con mayor volumen que el citoplasma y por tanto, es capaz de diluir el medio intracelular. Debido a este fenómeno, denominado de *washout* o “fenómeno de lavado celular”, algunos componentes celulares necesarios para la modulación intracelular (segundos mensajeros etc.) o para la activación de un canal se dializan hasta el punto de la inactivación. Un caso concreto de este fenómeno es la desaparición de la I_{CaL} con el tiempo, lo que en términos electrofisiológicos se denomina *run-down*. Otro inconveniente de esta técnica es el desajuste en los sistemas intracelulares de regulación del Ca^{2+} . Se han postulado diversas razones para justificar este problema. Una de ellas apunta a la salida de Ca^{2+} al exterior de la célula por vías no fisiológicas (salida por la porción de membrana rota por la pipeta), también es probable que el desequilibrio venga dado por el uso de sustancias quelantes del Ca^{2+} (por ejemplo, EGTA), o por la dilución de proteínas cuyo fin es el de fijar dicho catión. También es posible que la capacidad de los reservorios para captar o liberar Ca^{2+} esté alterada o que se origine alguna disfunción en la energía requerida por las bombas.

Por ello, para la investigación de mecanismos de acción intracelular es conveniente la aplicación de otra configuración distinta a la de “célula entera”, la configuración de parche perforado (*perforated-patch recording*), configuración modificada a partir de la anterior.

Configuración de parche perforado

El fundamento de la técnica del parche perforado fue descrito, primeramente, por Lindau y Fernández (1986) y posteriormente modificado y mejorado por Horn y Marty, (1988). En esta configuración la pipeta no entra en contacto directo con el citoplasma, como en el caso de la configuración de *whole-cell*. El contacto eléctrico se establece por la formación de poros en la porción de membrana donde se formó el sello. Dichos poros se forman gracias a la inclusión de un antibiótico (nistatina, anfotericina B, gramicidina, etc.) en la solución de la pipeta. Esta sustancia difunde a través de la membrana y va abriendo pequeños poros (selectivos para cationes monovalentes, principalmente) que hacen más difícil la pérdida de componentes citoplasmáticos fundamentales para la activación de las corrientes.

La aproximación experimental difiere en algunos aspectos al resto de las configuraciones descritas hasta el momento (figura 22). Como ya se ha mencionado, en la solución conductora se añadirá el antibiótico, anfotericina B, a una concentración aproximada de entre 50-100 $\mu\text{g/mL}$ (ver apartado de soluciones). Es conveniente dejar la punta de la pipeta sin antibiótico. De este modo, se evitará que éste actúe en zonas de la membrana distintas a la porción donde se formará el parche. Además, la aproximación a la célula será lo más rápida posible y sin la aplicación de presión positiva para que el contenido de la pipeta no se mezcle con el líquido extracelular, situación que sería letal para las células. Una vez conseguida la configuración de *cell-attached* bastará con esperar un período de tiempo de entre 10 a 35 min para conseguir la misma conexión eléctrica entre la célula y la pipeta que la obtenida en el caso de la configuración de *whole-cell*.

Esta configuración presenta grandes ventajas en estudios donde sea necesario preservar intacto el contenido citoplasmático. Por ejemplo, en la investigación de cascadas intracelulares. También es conveniente su uso en circunstancias en que sea imprescindible mantener estable la I_{CaL} u otras corrientes que también dependan de dicho ion, así como para preservar los mecanismos intrínsecos, asociados a la homeostasis del Ca^{2+} celular. También se ha visto que es útil en aquellos casos donde dado el pequeño tamaño de la célula, y por tanto de la pipeta, sea difícil preservar, de forma estable, el contacto eléctrico en otras configuraciones.

Es evidente que el uso del parche perforado ha permitido grandes avances en el conocimiento de cascadas intracelulares y de mecanismos de acción intracelular de algunos fármacos, que con otras técnicas resultaban confusos (Liu y Kennedy, 1998; Zhang y cols., 1998). Sin embargo, su uso se ve limitado por algunas desventajas quedando por ello, su empleo restringido a las necesidades y objetivos de cada investigador.

Por un lado, es importante reseñar que la mayoría de los poros producidos por los antibióticos utilizados, son impermeables a moléculas de gran tamaño. En concreto, sustancias con peso molecular mayor de 200 kDa, como nucleótidos cíclicos, péptidos, enzimas, sustancias quelantes (EGTA) o algunos indicadores fluorescentes. Este hecho, impedirá por tanto, introducir estas moléculas en la célula y como consecuencia modificar el medio intracelular.

Por otro lado, hay que destacar el posible desarrollo de una diferencia de potencial (*junction potential*) entre el contenido de la pipeta y el contenido celular. En general, este hecho suele estar desencadenado por la desigualdad en la composición iónica de una y otra solución, pero el equilibrio se establece minutos después de la obtención del parche de membrana. El problema fundamental en la configuración de parche perforado es que los poros que abre la anfotericina B son muy permeables para cationes monovalentes pero no lo son tanto para cationes divalentes o aniones (como el cloro por ejemplo). Por ello, el ion encargado de equilibrar la diferencia de cargas existente entre la pipeta y la célula (que contiene gran cantidad de macromoléculas cargadas negativamente) será el potasio, que atraviesa fácilmente el poro. Se establece entonces, un equilibrio tipo Donnan que desencadenará, por un lado, un desplazamiento en las curvas de activación de corrientes dependientes de voltaje, y por otro lado, un cambio en el volumen celular ocasionado por un desequilibrio osmótico que puede incluso dar lugar a la muerte de la célula por plasmólisis. La solución parcial a este inconveniente consiste en reemplazar parte del cloro contenido en la solución de la pipeta por aniones que no atraviesen el poro para así mantener estable la concentración intracelular de los mismos (ver apartado 3.3.3.2 de esta sección).

La configuración de parche perforado también tiene el inconveniente de presentar valores de resistencias en serie tres veces mayores que en la configuración de *whole-cell*, circunstancia que puede dar lugar a registros con escaso control de voltaje.

Inside-out patch

En esta configuración se obtendrá una pequeña vesícula adherida a la pipeta que pondrá en contacto el contenido citoplasmático con la solución contenida en el baño y la membrana externa de la célula con la solución de la pipeta (de ahí su nombre interior-fuera o *inside-out*) (figura 22). Para obtener esta configuración debemos llegar, como habitualmente, a la configuración de *cell-attached*. Posteriormente, la pipeta se retirará de la célula bruscamente para conseguir la citada vesícula que deberá ser abierta para observar la actividad del canal. En este caso concreto el contenido de la pipeta será similar al medio extracelular y la solución de perfusión similar al medio intracelular.

Outside-out patch

En esta configuración la superficie exterior de la célula constituye la cara externa de la vesícula y por tanto, queda en contacto con la solución de perfusión, mientras que la superficie citoplasmática constituye la cara interna de la vesícula y por tanto queda en contacto con la solución de la pipeta. Para obtener esta configuración se parte de la configuración de célula entera y se retira la pipeta lentamente de la célula.

Las dos últimas configuraciones descritas se diferencian del resto en que con ellas se puede estudiar la corriente que pasa a través de un solo canal (estudios de *single-channel*). Además, permite la modificación de ambos medios, el medio intracelular y el extracelular. Sin embargo, los estudios están limitados ya que la corriente en cuestión se encuentra aislada de todos los mecanismos reguladores del canal objeto de estudio.

En la presente tesis doctoral la técnica electrofisiológica utilizada será la de fijación de voltaje (*voltage-clamp*) en la configuración de célula entera (*whole-cell*) o en la configuración de parche perforado.

3.3.2. EQUIPO UTILIZADO

El equipo de fijación de voltaje (*voltage-clamp*), consta de un amplificador modelo Axopatch 1D con un preamplificador “*Headstage CV-4 1/100*” (Axon Instruments, Foster City, CA USA) controlado por un ordenador (IBM PC-AT) equipado con una tarjeta de conversión analógico digital Labmaster TL 1 (125 kHz). El amplificador está conectado, a su vez, a un osciloscopio. Las corrientes de membrana se

registraron con la ayuda de un programa de ordenador comercial, pClamp versión 6.0.4 (Axon Instruments) (figura 23).

Las pipetas de patch-clamp se fabricaron a partir de capilares de hematocrito de 1.5 de diámetro externo y cristal blando, con un estirapipetas programable modelo P-97 (Sutter Instruments Co.). La resistencia de la punta una vez llena la pipeta fue de 0.9-3 M Ω . Las resistencias en serie presentaban valores de 2 a 8 M Ω (el 60-80% de las resistencias en serie fueron compensadas).

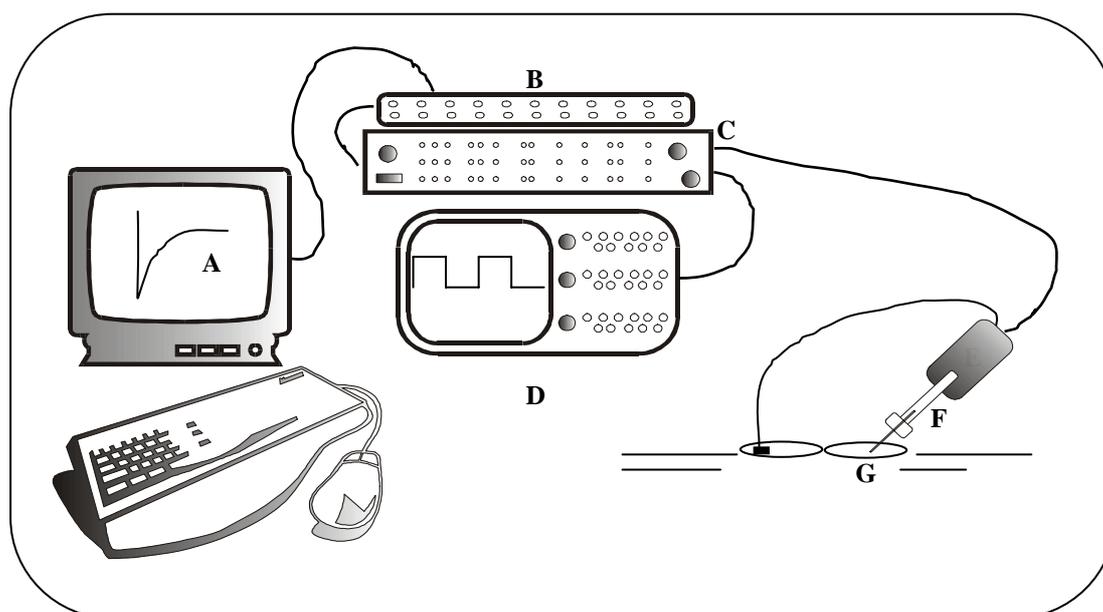


Fig 23. Esquema básico de un equipo de patch-clamp. A. Ordenador y programa pclamp6. B. Convertidor analógico digital. C. Amplificador. D. Osciloscopio. E. Preamplificador. F. Holder. G. Cámara de registro.

3.3.3. SOLUCIONES

Las soluciones utilizadas para el registro electrofisiológico de corrientes han de ser similares en su composición iónica, tanto al medio citosólico como al medio externo que rodea a la célula. Así, durante el período de experimentación dispondremos de una solución interna, que se introducirá en el interior de las micropipeta, y de una solución externa (también llamada de registro) que se encontrará bañando la superficie celular. Cuando el estudio electrofisiológico requiera el aislamiento de una corriente determinada, de las demás, será necesario el uso de bloqueantes específicos de los canales o bien habrá que sustituir equimolarmente a los iones transportadores de carga por otros iones incapaces de atravesar la membrana celular. En la elaboración de ambas soluciones se incluyó HEPES (ácido N-[2-hidroxietil] piperazina N-[2-etansulfónico]), como tampón ácido débil, para mantener el pH y glucosa como substrato metabólico.

3.3.3.1. SOLUCIONES EXTERNAS

➤ Solución externa utilizada para el registro de la I_{CaL}

Para el registro de la I_{CaL} se utilizó la solución que se detalla en la tabla 3. Es importante destacar que se utilizó la misma solución de registro tanto para los experimentos realizados en la configuración de célula entera como para los que se llevaron a cabo en la configuración de parche perforado.

Tabla 3. Solución de registro de I_{CaL} .	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	140
CsCl	5,4
CaCl ₂	1,8
MgCl ₂	1,1
Glucosa	10
Hepes	5
pH = 7,4 (Ajustar con NaOH)	

La I_{Na} fue bloqueada de forma irreversible con TTX a una concentración de 30 μ M. Por otro lado, el potasio se sustituyó de forma equimolar por cesio (CsCl), para eliminar las corrientes de potasio.

➤ Solución externa utilizada para el registro de la I_{to} en la configuración de célula entera

Para eliminar la contaminación con las corrientes de sodio, este ion se sustituyó de forma equimolar por colina. De este modo, se consigue eliminar las corrientes de potasio activadas por sodio, las corrientes transitorias generadas por la bomba Na^+/K^+ y las corrientes provocadas por el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Lefevre y cols., 1991). También se añadió sulfato de atropina para bloquear la posible activación de la corriente de fondo sensible a acetil-colina (I_{KAch}).

La composición de dicha solución aparece reflejada en la tabla 4, que se muestra a continuación:

Tabla 4. Solución de registro de I_{to} en la configuración de célula entera.	
Compuesto	Concentración (mM)
Colina	135
KCl	5,4
CoCl₂	2
MgCl₂	1
Glucosa	10
Sulfato de Atropina	0,01
Hepes	10
CaCl₂	1
pH = 7,4 (Ajustar con KOH)	

➤ **Solución externa utilizada para el registro de la I_{to} en la configuración de parche perforado**

A diferencia de la solución anterior, no se utilizó colina para eliminar las corrientes de sodio. La presencia de colina en el exterior de la célula invierte el funcionamiento del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , de tal forma que sale Na^+ y entra Ca^{2+} al interior celular. Al no haber EGTA en el interior (pues no atraviesa el poro que abre la anfotericina) el Ca^{2+} induce la contracción de las células y dificulta el proceso de apertura del sello. Por ello, se optó por una solución con una composición iónica más fisiológica y en lugar de colina se añadió cloruro sódico y la corriente de sodio se bloqueó con TTX.

La composición de dicha solución se detalla en la tabla 5 que se muestra a continuación:

Tabla 5. Solución de registro de I_{to} en la configuración de parche perforado.	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	135
KCl	5,4
CoCl₂	2
MgCl₂	1
Glucosa	10
Hepes	10
CaCl₂	1
pH = 7,4 (Ajustar con KOH)	

Para el estudio de la corriente de potasio sensible a 4-AP ($I_{to(4-AP)}$) fue necesario añadir este compuesto en la solución de registro a la concentración de 3 mM.

3.3.3.2. SOLUCIONES INTERNAS

➤ **Solución interna para el registro de I_{CaL} en la configuración de célula entera**

Como se ha mencionado anteriormente, las soluciones internas han de tener cierta similitud con la composición iónica del citoplasma. La concentración de Ca^{2+} libre intracelular es muy pequeña, del orden de 10^{-8} M. Por ello, para mantenerlo en ese rango durante los experimentos es necesario el uso de quelantes de Ca^{2+} . En la presente tesis doctoral, se utilizó el EGTA (ácido etilén glicol bis (β -aminoetil éter) NNN'N' tetracético) como sustancia quelante. Esta estrategia facilita considerablemente la consecución y posterior estabilidad del sello obtenido en la configuración de célula entera (Marty y Neher, 1983) y minimiza las corrientes activadas por el Ca^{2+} , así como la corriente del intercambiador Na^+/Ca^{2+} . Sin embargo, es importante considerar la concentración de EGTA utilizada, porque concentraciones demasiado elevadas podrían enmascarar los efectos de algunos fármacos (Kawamura y cols., 1994). En el caso concreto del estudio de la I_{CaL} , el potasio, ion mayoritario del contenido citoplasmático,

fue sustituido de forma equimolar por el cesio. De este modo, se eliminaban las corrientes de salida de potasio ya que el canal no es permeable a este ion. Por el mismo motivo, se añadió TEA. Se utilizaron, además, compuestos de alto valor energético, como son el ATP, el guanosín trifosfato (GTP) o la fosfocreatina disódica, con el fin de mantener a la célula en las condiciones óptimas durante todo el experimento y para evitar, en la medida de lo posible, el fenómeno de desaparición de la corriente con el tiempo (conocido en electrofisiología como fenómeno de *run-down*).

La composición detallada de la solución interna utilizada para el estudio de la I_{CaL} en la configuración de célula entera se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Solución interna de I_{CaL} para la configuración de célula entera.	
Compuesto	Concentración (mM)
CsCl	100
EGTA	5
TEA	20
Mg₂ATP	5
Mg₂GTP	0,4
Na₂Fosfocreatina	5
Hepes	10
CaCl₂	0,06
pH = 7,2 (Ajustar con CsOH)	

➤ **Solución interna para el registro de I_{CaL} en la configuración de parche perforado**

La solución interna utilizada en esta configuración es bastante más sencilla que la utilizada en la configuración de célula entera. Hay que tener en cuenta que las moléculas de gran tamaño como el EGTA, el ATP, el GTP, etc., utilizadas anteriormente, para preservar en las mejores condiciones posibles el medio intracelular, ahora no son necesarias ya que con este método se evita la diálisis de componentes

intracelulares, imprescindibles para la viabilidad de la célula. Además, no hay que olvidar que su gran tamaño les impide atravesar los poros abiertos por la anfotericina B.

Aunque en condiciones normales, la concentración de Ca^{2+} añadido a la solución interna debe ser mínima, en el caso que nos ocupa se añadió 1 mM de CaCl (concentración deletérea para la célula). El Ca^{2+} , catión divalente, es incapaz de atravesar los poros inducidos por la anfotericina B. Sin embargo, pasaría libremente en el caso de la ruptura accidental del parche (a la configuración de célula entera). Si esto sucediera, la entrada masiva de Ca^{2+} en la célula, sin EGTA en el interior para quelarlo, induciría efectos deletéreos sobre la misma. Así, se consigue el efecto buscado, pues proporciona al experimentador la seguridad de encontrarse en todo momento en la configuración deseada.

La composición de la solución interna se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7. Solución interna de I_{CaL} para la configuración de parche perforado.	
Compuesto	Concentración (mM)
CsOH	110
Ácido glutámico	110
CsCl	10
NaCl	10
CaCl₂	1
HEPES	5
pH = 7,2 (Ajustar con CsOH)	

El uso de ácido glutámico (para formar la sal de cesio), en vez de cloro, se justifica ya que se ha visto que las concentraciones bajas de cloro favorecen la duración en el tiempo de los experimentos (Kawamura y Wahler, 1994). Además, como se comentó anteriormente, la concentración de cloro añadida a la pipeta no debe ser muy diferente a la concentración citosólica de cloro porque de lo contrario, se establece un desequilibrio iónico y por consiguiente una diferencia de potencial entre la solución de la pipeta y el contenido citosólico, difícil de regular por la imposibilidad de paso de aniones a través de los poros. Todo ello, desencadenaría un equilibrio de Donnan y

consecuentemente un desplazamiento en las curvas de activación, así como un desequilibrio osmótico que redundaría en la variación del tamaño celular.

La solución de la pipeta contiene también anfotericina B en un rango de concentraciones que oscilan entre 50 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver apartado 3.3.3.3 de Material y Métodos).

➤ **Solución interna para el registro de I_{t_0} en la configuración de célula entera**

La solución interna utilizada se muestra a continuación:

Tabla 8. Solución interna para I_{t_0} en la configuración de célula entera.	
Compuesto	Concentración (mM)
EGTA	10
KCl	150
MgCl₂	1
HEPES	5
Glucosa	10
GTPNa₂	0.4
ATPNa₂	5
pH = 7,2 (Ajustar con KOH)	

➤ **Solución interna para el registro de I_{t_0} en la configuración de parche perforado**

La solución utilizada registrar I_{t_0} en la configuración de parche perforado es prácticamente igual a la utilizada para registrar la I_{CaL} . La única diferencia es que en este caso el ion transportador de carga es el potasio en lugar del cesio.

Tabla 9. Solución interna para I_{to} en la configuración de parche perforado.	
Compuesto	Concentración (mM)
Ácido glutámico	110
KOH	110
KCl	10
NaCl	10
CaCl₂	1
HEPES	5
pH = 7,2 (Ajustar con KOH)	

3.3.3.3. PRODUCTOS QUÍMICOS Y FÁRMACOS

➤ **Preparación de Anfotericina B**

La anfotericina B es un antibiótico poliénico que destaca en farmacología por su acción fungicida. Su actividad letal sobre las células se debe a la capacidad de unión del fármaco a los esteroides de las membranas celulares y abrir poros, variando así su permeabilidad a ciertos cationes (sodio, potasio e hidrógeno). En electrofisiología, se utiliza precisamente por su capacidad de abrir poros en la porción de membrana delimitada por la pipeta (Rae y cols., 1991). De este modo, se consigue la conexión eléctrica, y el posterior registro de corrientes iónicas, evitando la pérdida de la integridad del contenido intracelular.

El fármaco en cuestión es sensible a la luz por lo que es aconsejable que la preparación se realice en oscuridad (aunque una vez preparada se puede trabajar con luz fluorescente sin alterar su actividad). La solución madre se preparó a una concentración de 50 mg/mL. La anfotericina B se disolvió en DMSO. El uso de un ultrasonificador de émbolo facilitó considerablemente la disolución del antibiótico. Justo en el momento de su utilización, se añadió a la solución interna en una concentración que oscilaba entre 50 y 150 $\mu\text{g/mL}$.

➤ **Preparación del Neuropeptido Y (NPY)**

El NPY en el hombre, en la rata, en el conejo y en el cobayo es idéntico y posee Metionina (MET) en la posición 17 (fácilmente oxidable). Sin embargo, la estructura del NPY porcino y bovino se caracteriza porque en posición 17 tiene el aminoácido leucina (LEU) (menos susceptible de oxidación) (ver Introducción, figura 11).

El aminoácido MET se oxida más fácilmente que la LEU, hecho importante en la evaluación de la actividad biológica del péptido, cuya mayor actividad se ha demostrado en la forma reducida. Así, se sabe que la forma sintética de NPY humano pierde actividad cuando se almacena en solución. Este hecho, justifica el uso de NPY porcino en nuestros estudios.

La preparación del NPY es sencilla puesto que es soluble en agua. Se preparó una solución madre a la concentración de 10^{-4} M y posteriormente se añadió, a la concentración final de 100 nM, a la solución de registro o sobre las propias células según el tipo de experimento a realizar, efecto agudo del fármaco o efecto a largo plazo, respectivamente.

➤ **Preparación de los antagonistas selectivos del receptor Y_1 e Y_2**

Antagonista del receptor Y_1 (BIBP3226)

El N2-(Difenilacetil)-N-[(4-hidroxi-fenil) metil]-D-arginina amida (BIBP3226) es un antagonista selectivo de los receptores Y_1 (Rudolf y cols., 1994). Su estructura no péptidica se asemeja al tripéptido del carbono terminal del NPY (Pheng y Regoli, 2000). Se disolvió en una mezcla de agua y DMSO, siendo la concentración final de este último de 0,01%. La concentración final de antagonista fue de 1 μ M.

Antagonista del receptor Y_2 (BIIE0246)

El BIIE0246 ((R)-N [4-(aminocarbonilaminometil)-fenil]-N2-(difenilacetil)-argininamida trifluoroacetato) es un antagonista selectivo de los receptores Y_2 (Doods y cols., 1999; Dumont y cols., 2000). Contiene una arginina, similar al carbono terminal del NPY. En la presente tesis doctoral se utilizó a la concentración final de 1 μ M, conteniendo un 0,01% de DMSO.

3.3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

3.3.4.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DE CÉLULA ENTERA

Transcurrido un tiempo aproximado de una hora o dos después de haber llevado a cabo la disociación de los miocitos cardíacos de rata (período de estabilización de las células), se procedió al registro de las corrientes de membrana. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente con el fin de hacer más lentas las cinéticas de las corrientes en estudio y poderlas separar fácilmente de las espigas capacitivas.

Se puso una alícuota de la suspensión celular en la cámara de registro situada en la platina de un microscopio invertido Olympus IMT-2. Se esperó un tiempo prudencial hasta que las células se hubieron depositado en la base de cristal de la cámara. Transcurrido este tiempo, las células se perfundieron, con las soluciones de registro modificadas o no por la adición de diferentes fármacos, según el interés del experimento a realizar, a un flujo constante de 2 mL/min. El flujo se controló mediante una bomba peristáltica (Eyela MP3), de 4 vías para permitir el cambio rápido de una solución a otra. A continuación, se eligió una célula con la simetría adecuada (rectangular) y que no estuviera contrayéndose de forma espontánea. Por otro lado, a la pipeta, llena con una solución intracelular adecuada según el experimento a realizar, se le introdujo un electrodo de plata (previamente clorurado) conectado a su vez con el resto del equipo (ver figura 23). Posteriormente, se introdujo la pipeta, con una ligera presión positiva, en el líquido de perfusión y se ajustó a cero, manualmente, la diferencia de potencial existente entre el exterior y el interior de la pipeta. Con la ayuda del micromanipulador (Narishigue) se acercó la punta de la pipeta a la superficie de la célula hasta que ambas superficies se tocaran. Este hecho se apreció en el osciloscopio (Techtronix 5110), puesto que durante todo el tiempo se había estado dando pulsos de 5 mV, y en el osciloscopio se registraba la corriente en respuesta al diferente potencial entre el interior y el exterior de la pipeta. Justo en el momento en que la pipeta se pone en contacto con la superficie de la célula, la señal en el osciloscopio se vuelve muy ruidosa. Este es el momento en el que se elimina la presión positiva y se ejerce una ligera presión negativa, mediante ligera succión, lo que conlleva la formación del sello de alta resistencia. Una vez formado el sello, en el osciloscopio no se observa ninguna corriente en respuesta al potencial aplicado, debido a la gran resistencia del sello conseguido. Para conseguir la configuración de célula entera o *whole-cell*, es necesaria la ruptura del sello mediante la

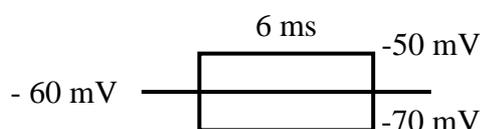
aplicación de una succión brusca (se produce la ruptura de la porción de membrana delimitada por los bordes de la pipeta). De este modo, la pipeta y todo su contenido entran en contacto con el interior celular consiguiendo el acceso químico y eléctrico buscado. Una vez que se ha conseguido con éxito la configuración de célula entera es aconsejable esperar unos 5 minutos aproximadamente, antes de realizar el registro electrofisiológico, para permitir la diálisis del líquido intracelular con el líquido de la pipeta y la estabilización de las corrientes.

3.3.4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DE PARCHE PERFORADO

El modo de actuación para conseguir la configuración de parche perforado es bastante parecido al explicado en el apartado anterior, pero con algunas variaciones. En primer lugar, el sello de alta resistencia se consigue sin aplicar a la pipeta presión positiva. Una vez conseguido el sello de alta resistencia, no se lleva a cabo la ruptura, puesto que la pipeta contiene en su interior una sustancia antibiótica capaz de abrir pequeños poros, que permitirán el acceso eléctrico. Así, una vez conseguido el sello, se aplicó un protocolo que permitiera ver como se iba estableciendo el contacto eléctrico de forma gradual. El protocolo consistía en la aplicación de pulsos despolarizantes desde un potencial de fijación (PF) de -60 mV hasta -40 mV. Con esta maniobra podíamos ver el grado de perforación del parche a lo largo del tiempo. Cuanto mayor era el contacto eléctrico las espigas capacitivas eran mayores y mayor era la I_{Na} que generalmente, aparece al potencial test aplicado. El registro electrofisiológico se llevaba a cabo 35-40 minutos después de haber conseguido el sello de alta resistencia.

3.3.4.3. MEDIDA DE LA CAPACITANCIA Y RESISTENCIAS EN SERIE

La capacitancia de membrana (C_m) se midió en cada célula. Se puso de manifiesto aplicando pulsos de voltaje de ± 10 mV de 6 ms de duración, desde su potencial de reposo (potencial de la célula cuando la corriente era 0).



La capacitancia da información indirecta de la superficie celular ($1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_m = \tau_c I_0 / \Delta V_m [1 - (I_\infty / I_0)]$$

donde τ_c es la constante de tiempo de caída de la capacitancia, I_0 es el máximo valor de la amplitud de corriente, ΔV_m es el valor del pulso de voltaje y I_∞ es la amplitud de corriente al final del pulso (Reuter y Scholz, 1977).

La resistencia en serie se calculó a partir del mismo registro, mediante la ecuación:

$$R_s = \tau_c / C_m$$

donde R_s es la resistencia en serie.

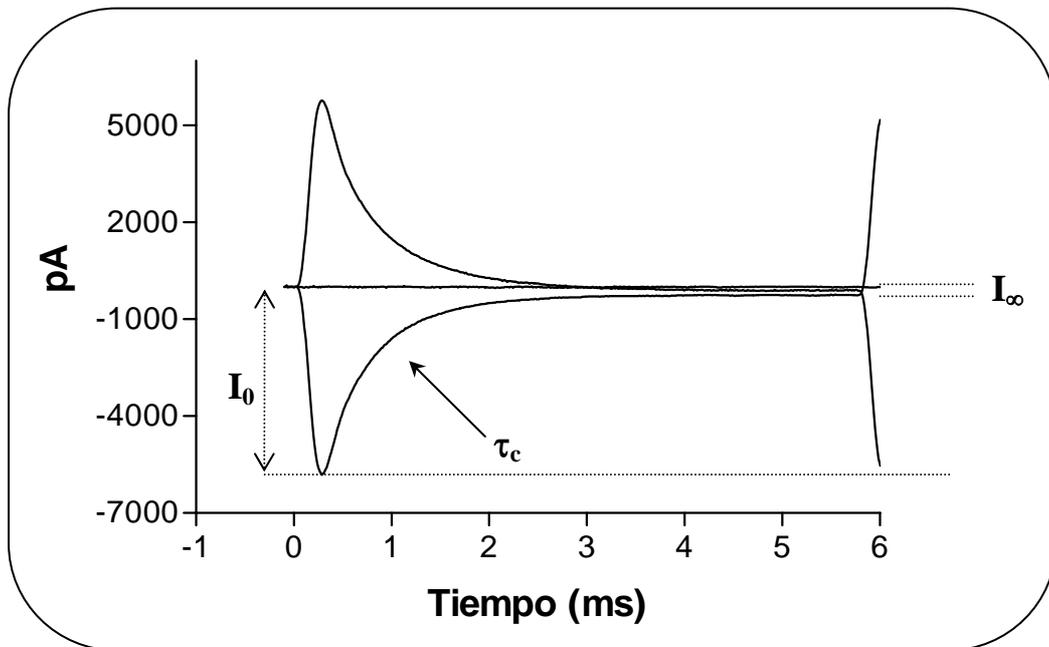
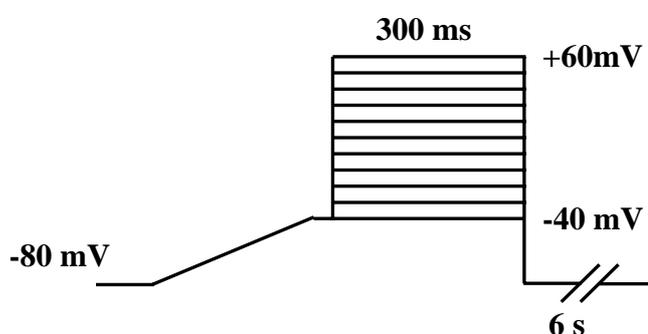


Figura 24. Ejemplo de un trazo de capacitancia celular y los parámetros para su correcto análisis

3.3.4.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EL REGISTRO DE I_{CaL}

➤ **Medición de las corrientes. Relación corriente-voltaje**

Los registros de corriente se iniciaron 8 minutos después de la ruptura del sello. La I_{CaL} se puso de manifiesto aplicando pulsos de voltaje en incrementos de 10 mV, durante 300 ms a 0,2 Hz de frecuencia, siendo el intervalo de tiempo entre pulsos de 6 segundos. Por tanto, desde un PF de -80 mV se aplicaba una rampa hasta -40 mV que era seguida por la aplicación de pulsos despolarizantes desde -40 hasta $+60$ mV. La rampa se utilizó para inactivar la corriente de sodio, presente desde -40 mV hasta -10 mV, aproximadamente.



Los registros de corriente se midieron en amplitud de corriente. Este parámetro se define como la diferencia entre la corriente medida en el pico máximo (I_0) menos la corriente medida al final del pulso (I_∞) (figura 25).

Es lógico pensar que cada célula expresa una I_{CaL} de una amplitud proporcional a su tamaño. Por ello, para poder comparar los registros de corriente entre distintas células, lo más correcto es expresar los valores de corriente en densidad. Es decir, los valores de amplitud se normalizan por la capacitancia de membrana. De este modo, si representamos la densidad de corriente obtenida frente a cada potencial aplicado obtendremos lo que se denomina “curva densidad de corriente-voltaje” que a su vez nos mostrará la dependencia del voltaje de la corriente estudiada.

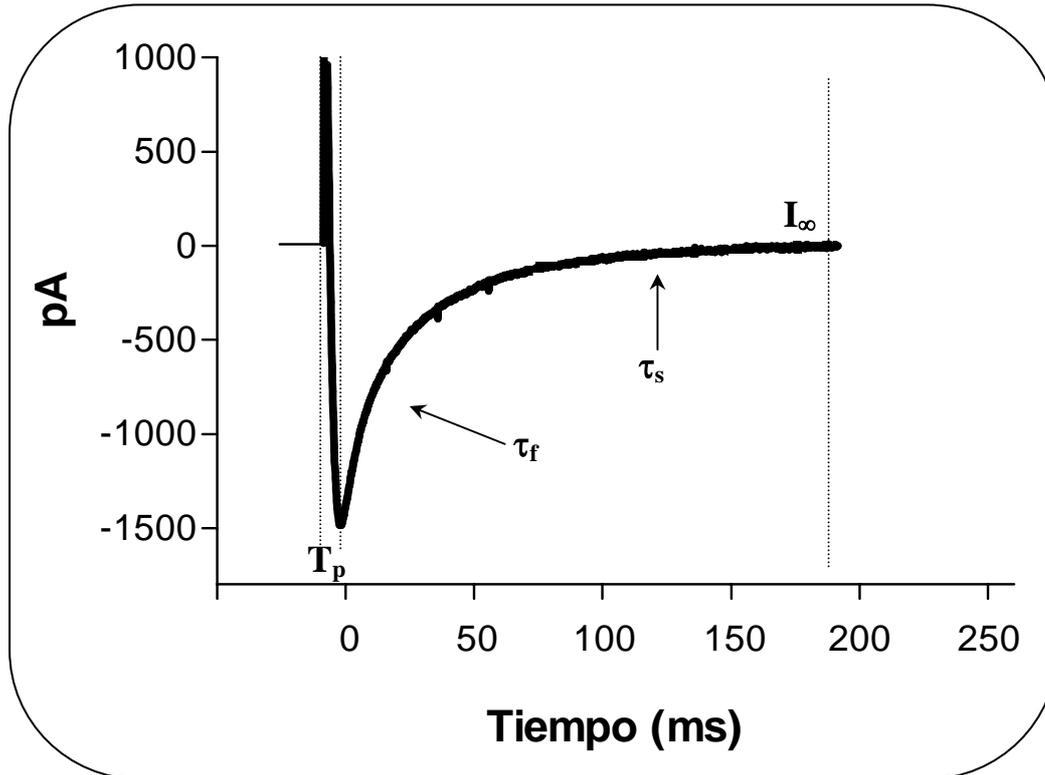
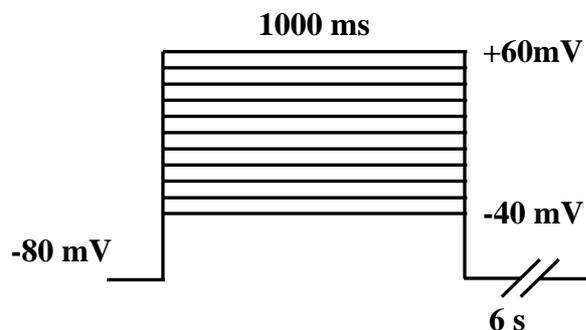


Figura 25. Ejemplo de un trazo de I_{CaL} a -10 mV y los parámetros para su análisis. τ_f : constante de tiempo de inactivación rápida. τ_s : constante de tiempo de inactivación lenta. T_p : tiempo al pico.

3.3.4.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EL REGISTRO DE I_{to}

La I_{to} se puso de manifiesto aplicando pulsos de voltaje en incrementos de 10 mV, durante 1000 ms a 0,2 Hz de frecuencia, siendo el intervalo de tiempo entre pulsos de 6 segundos. Por tanto, desde un PF de -80 mV se aplicaban pulsos despolarizantes desde -40 hasta $+60$ mV.



Como en el caso de la I_{CaL} la corriente de potasio también se midió en amplitud y los datos de dicha amplitud se normalizaron entre la capacitancia para ser expresados en densidad de corriente.

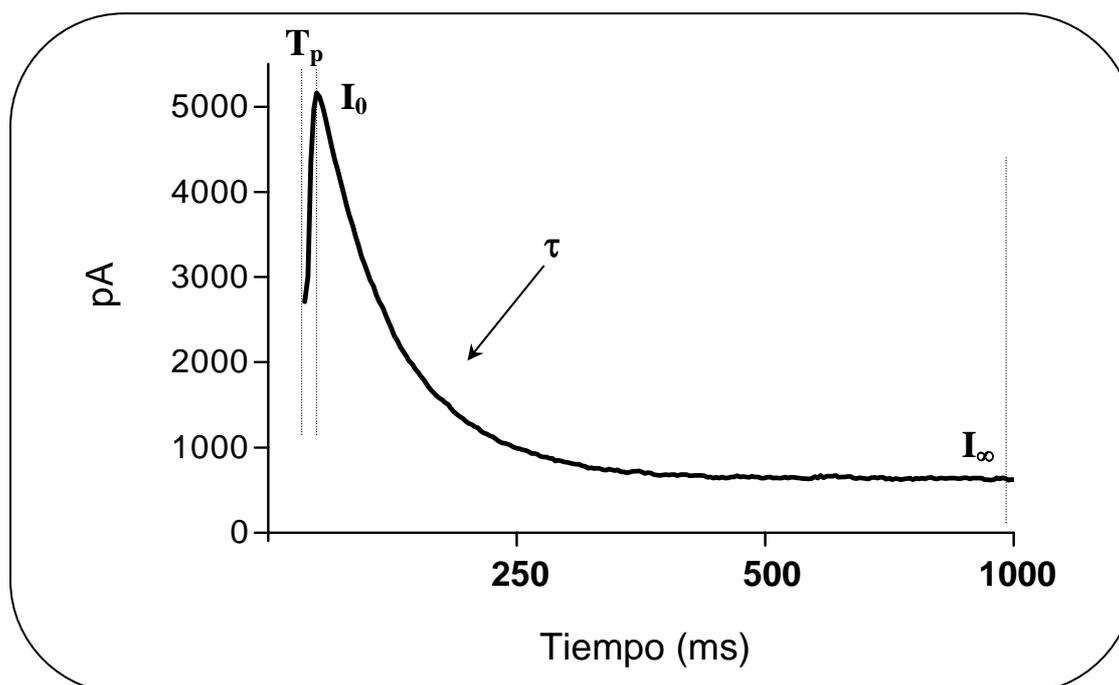


Figura 26. Ejemplo de trazo de I_{to} a +40 mV y los parámetros para su correcto análisis.

Se ha descrito que la corriente de potasio aislada con este protocolo consta básicamente de dos componentes, el componente sensible a la 4-aminopiridina (4-AP) (bloqueante parcial de la corriente de potasio) y el componente insensible a ella (Apkon y Nerbonne, 1991). En la presente Tesis Doctoral, se analizó el efecto del NPY sobre la corriente como mezcla de ambos componentes, pero también se estudió el efecto sobre el componente sensible a la 4-AP ($I_{to(4-AP)}$). Para aislar dicho componente bastó sustraer la corriente obtenida después de la perfusión con 4-AP, de la corriente obtenida en ausencia de la misma (se explicará más detalladamente en la correspondiente sección de resultados).

Otros autores habían utilizado la 4-AP como herramienta farmacológica para separar el componente independiente de Ca^{2+} (Hiraoka y Kawano, 1989; Tseng y Hoffman, 1989, Gómez y cols., 1997). La 4-AP es una amina terciaria capaz de bloquear el canal de I_{to} . Este bloqueo es inverso a la uso-dependencia. Es decir, es más efectivo a bajas que a altas frecuencias debido a la unión y desunión del compuesto durante el estado de reposo y de activación, respectivamente (Jahnel y cols., 1994). Además, el mecanismo de bloqueo se explica gracias a su estructura terciaria capaz de estar en la forma no protonada cuando precisa atravesar la membrana o en la protonada cuando debe bloquear el canal. Debido a su mejor actividad cuando se encuentra

protonada los niveles de pH bajos en el interior de la célula favorecen el bloqueo (Wegener y cols., 1998).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la presente Tesis Doctoral se expresaron como la media \pm EEM (error estándar de la media). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de la t de Student para datos pareados o no pareados, según el caso. Se consideró un nivel de $p < 0.05$ como punto de mínima diferencia significativa en cada comparación, y el nivel de $p < 0.001$ como punto óptimo de diferenciación significativa.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

El estudio de los efectos y mecanismos del NPY en el corazón se abordó desde dos aproximaciones experimentales diferentes. En primer lugar, se analizó el efecto del NPY sobre la contracción y sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando técnicas de fluorescencia. Posteriormente, se estudió el efecto del NPY sobre algunas corrientes de membrana (I_{CaL} e $I_{to(4-AP)}$). Para ello, se utilizó la técnica electrofisiológica de patch-clamp (fijación de voltaje), en la configuración de célula entera y en la de parche perforado.

4.1. ESTUDIOS DE FLUORESCENCIA

4.1.1. MODULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} POR NPY

Hoy en día, las acciones cardíacas del NPY continúan siendo motivo de discusión. La disparidad de resultados radica por un lado, en las innumerables técnicas, especies y tejidos utilizados para el examen de la cuestión y por otro, en la dificultad de aislar los efectos cardíacos de los vasculares. Sin embargo, el problema no se soluciona si se analizan sólo los resultados obtenidos para una misma especie y tejido. Por ejemplo, en los miocitos de rata algunos autores describieron un efecto negativo sobre la contracción (Balasubramaniam y cols., 1988; Piper y cols., 1989; Millar y cols., 1991), otros apuntaron la ausencia de efectos (Woo y Ganguly, 1995), mientras que otros postulaban una dualidad de efectos, ya que observaban efectos positivos cuando la $I_{to(4AP)}$ se encontraba bloqueada y los efectos contrarios cuando no había bloqueo (Millar y cols., 1991).

Todo estas contradicciones fueron las responsables de que decidiéramos abordar el problema con otra aproximación experimental. En este caso, se disponía de técnicas de fluorescencia, que acopladas a un microscopio confocal permitieron el estudio simultáneo de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ y de la contracción.

Por ello, se realizó una investigación en miocitos ventriculares de rata utilizando la técnica de estimulación de campo (ver sección 3.2.6.2. de Material y Métodos). Con ella, se indujo un PA y por tanto, la contracción de la célula. En este proceso, la entrada de Ca^{2+} en la célula a través del canal de Ca^{2+} tipo L (durante la fase 2 del potencial de acción), desencadena la liberación de mayores cantidades de

Ca^{2+} del RS (ver apartado 1.2.3 de la Introducción). Esta movilización de Ca^{2+} se puede medir cargando las células con un indicador fluorescente.

4.1.1.1 EFECTO DEL NPY (100 nM) SOBRE EL TRANSIENTE GLOBAL DE $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Los estudios preliminares se realizaron en un microscopio de epifluorescencia (Sección 3.2.4.1 de Material y Métodos). De esta forma, se pudo investigar si el NPY tenía algún efecto sobre el transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Si esto sucedía, los siguientes estudios se llevarían a cabo en el microscopio confocal, lo que permite, entre otras muchas ventajas (ver sección 3.2.4.2 de Material y Métodos), medir el efecto del NPY sobre la contracción, así como hacer un estudio exhaustivo del efecto del péptido sobre los *sparks* de Ca^{2+} (ver siguientes apartados).

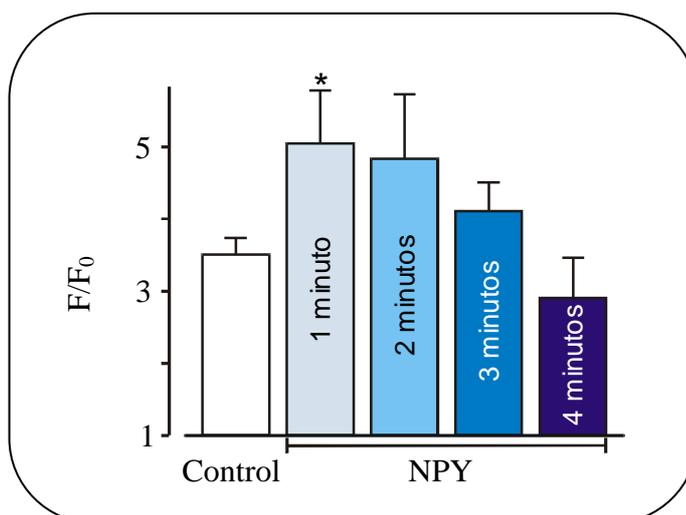


Figura 27. Efecto del NPY sobre el transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a distintos tiempos. La señal fluorescente (F) fue normalizada con respecto a la señal de la base (F_0). En el interior de cada barra se muestra el tiempo durante el cual la célula se perfundió con NPY. Los datos se representan como la media \pm EEM. * $p < 0,05$.

En primer lugar, se estudió el efecto de 100 nM de NPY sobre el transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a distintos tiempos. Como muestra la figura 27, el NPY aumentó de forma significativa ($p < 0,05$) la amplitud máxima del transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, durante el primer minuto de aplicación. Así, la fluorescencia máxima en 10 células (normalizada con respecto a la fluorescencia basal, F/F_0) fue de $3,52 \pm 0,22$ en control y de $5,05 \pm 0,73$ después de la perfusión con NPY. A los 2 y 3 minutos, se observó un incremento menos marcado (en 8 y 4 células, respectivamente), en los valores de

amplitud máxima. Por último, a los 4 minutos de perfusión con NPY, el efecto desapareció, y la fluorescencia máxima volvió a establecerse a valores similares a los del control (n=4). Con estos experimentos quedó demostrado que el NPY (a la concentración de 100 nM) tenía un efecto positivo sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, y que dicho efecto era máximo cuando el tiempo de perfusión era de un minuto. Por tanto, todos los experimentos que siguieron, se realizaron bajo las condiciones establecidas. Es decir, perfundiendo con NPY **durante un minuto** y utilizando como **concentración de elección 100 nM de NPY**.

A continuación, se realizaron otros experimentos de estimulación de campo, pero esta vez en el microscopio confocal, lo que nos permitió comprobar si además de un efecto sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, había alguna variación en la contracción.

Los datos obtenidos, en 8 células cardíacas, corroboraron los resultados preliminares realizados en el microscopio de epifluorescencia. El NPY produjo un aumento en el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ (figura 28), de manera que en condición control, la media de los valores de amplitud máxima (representados como F/F_0) fue de $2,58 \pm 0,24$, y una vez que se perfundió la célula durante 1 min con NPY, el valor medio de máxima fluorescencia fue de $3,73 \pm 0,49$ ($p < 0,01$).

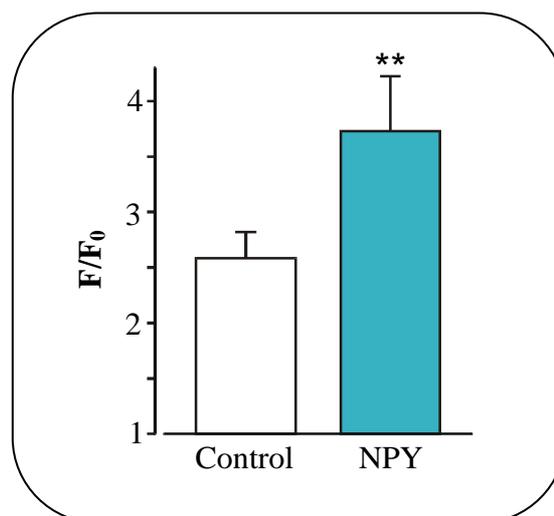


Figura 28. El NPY aumenta la amplitud del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$. El diagrama de barras representa los valores medios de máxima fluorescencia (F/F_0) obtenidos en 8 células ventriculares, antes (barra blanca) y después (barra azul) de la perfusión con NPY. ** $p < 0,01$.

También se analizó si había variaciones en la cinética del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$. Para ello, se ajustó la fase descendiente del trazo fluorescente a una función exponencial simple (ver sección de Material y Métodos, figura 21).

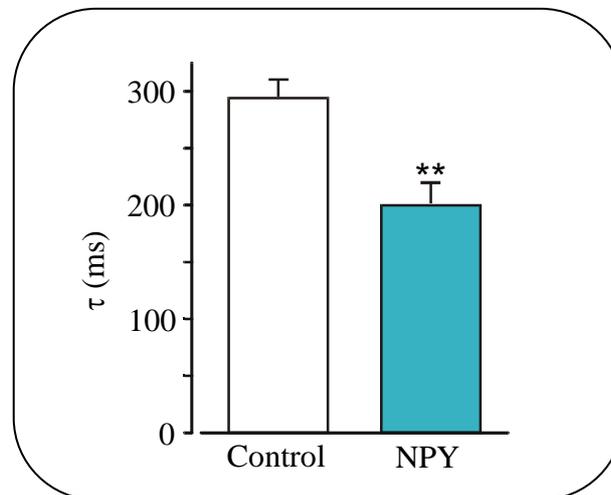


Figura 29. El NPY acelera la cinética del transiente de $[Ca^{2+}]_i$. El diagrama de barras representa los valores medios, de la constante de tiempo de relajación del transiente de $[Ca^{2+}]_i$, obtenidos en 8 células ventriculares, antes (barra blanca) y después (barra azul) de la perfusión de NPY. El tiempo de relajación se obtuvo mediante el ajuste del trazo fluorescente a una función exponencial simple. ** $p < 0,01$.

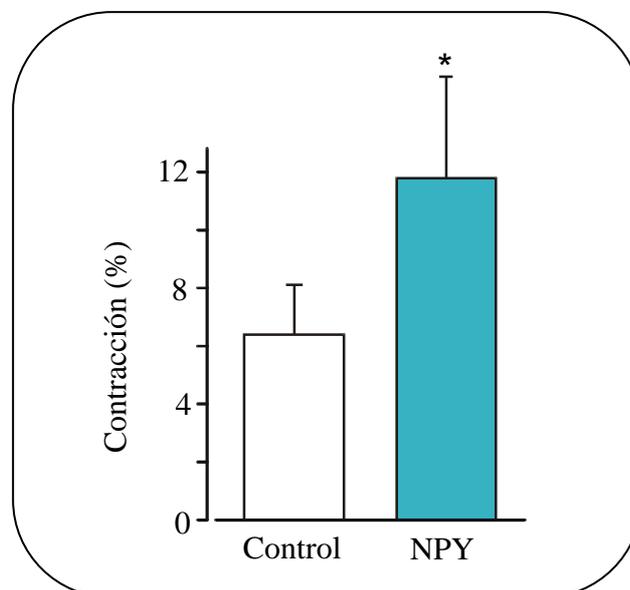


Figura 30. El NPY incrementa el porcentaje de contracción en células ventriculares de rata. La gráfica de barras muestra los datos medios de contracción de 8 miocitos antes y después de la perfusión con NPY. Los datos se expresaron en porcentaje de contracción. La barra blanca representa los datos medios en control y la barra azul muestra los datos medios una vez aplicado el NPY. * $p < 0,05$.

La figura 29 muestra que la aplicación de NPY induce una aceleración del tiempo de relajación, tal y como demuestran los datos medios, obtenidos para 8 miocitos (constante de relajación, τ : $293,86 \pm 14,97$ ms antes y $199,98 \pm 18,20$ ms después de 1 min de perfusión con NPY, $p < 0,01$).

Cuando se tratan las células con NPY, el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ aumenta, por tanto, es razonable que aumente el porcentaje de contracción, ya que hay más Ca^{2+} en el medio para activar las proteínas contráctiles. El equipo utilizado para realizar estos experimentos permitió analizar el acortamiento de la célula durante el proceso de contracción. Según lo esperado, el NPY incrementó el porcentaje de contracción (figura 30) desde valores medios de $6,39 \pm 1,72$ % para el control, hasta valores medios de $11,79 \pm 3,49$ % después de la aplicación del péptido ($p < 0,05$; $n=8$).

En la figura 31 se muestra una imagen representativa, obtenida mediante barrido de línea, y su correspondiente transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, en situación control, y después del tratamiento del miocito con NPY. En ella se observa el aumento del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, la aceleración del mismo y el aumento en la contracción después de la administración del NPY.

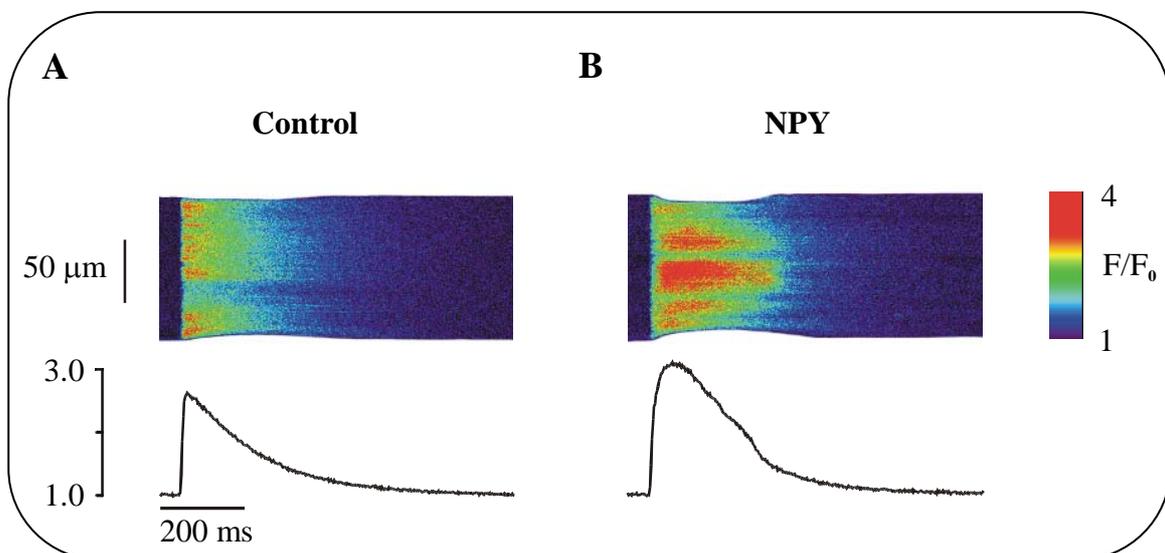


Figura 31. El NPY modifica el acoplamiento E-C. Imágenes de barrido de línea (A y B, panel superior) mostrando el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ obtenido durante la estimulación de una célula a 1 Hz de frecuencia antes (A) y después (B) de la perfusión con NPY. En el panel inferior (A y B) se observa el transiente obtenido a partir de la imagen. La señal fluorescente (F) fue normalizada con respecto a la señal de la base (F_0).

En principio, la modificación de los parámetros básicos que constituyen un transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, en células tratadas con NPY, podría ser consecuencia de cualquiera de los siguientes fenómenos ocurridos durante el acoplamiento E-C:

En primer lugar, podría verse afectada la I_{CaL} (quien desencadena la activación de los RyR). Un aumento de la misma implicaría un mayor número de RyR activados y por tanto, mayor liberación de Ca^{2+} del RS. El estudio del efecto del NPY sobre la I_{CaL} supuso otro capítulo de esta tesis doctoral y por ello, será comentado en el siguiente apartado.

Por otro lado, el **contenido de Ca^{2+} del RS** podría encontrarse modificado. Este hecho sería factible en el caso que nos ocupa, ya que según los resultados anteriores la constante de tiempo de relajación se acelera. La aceleración de la constante de tiempo de relajación (τ) implica una recaptación más rápida del Ca^{2+} liberado y por tanto, un incremento en la velocidad de actuación de la SERCA. Si lo anterior es cierto, cabe la posibilidad de que el contenido de Ca^{2+} del RS sea mayor, porque trabajando más rápido, la SERCA es capaz de introducir mayores cantidades de Ca^{2+} en el RS. Para estudiar el contenido de Ca^{2+} del RS se utilizó cafeína, a la concentración de 10 mmol/L. La cafeína tiene la propiedad de vaciar el RS ya que abre los RyRs, manteniéndolos abiertos mientras esté presente. De este modo, es fácil saber la cantidad de Ca^{2+} existente en el RS ya que la unión de la cafeína al RyR inducirá el vaciamiento total del RS. Al mismo tiempo nos puede dar una idea de la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , puesto que en presencia de cafeína, el efecto de la SERCA queda anulado (aunque recapte Ca^{2+} , éste es liberado de inmediato por los RyRs bloqueados en el estado abierto). En este caso, la relajación del transiente de Ca^{2+} evocado por la cafeína dependerá mayoritariamente de la extrusión de Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} .

Para llevar a cabo estos experimentos, se estimuló a las células durante dos minutos a 1 Hz de frecuencia de forma que el RS se encontrara en estado estacionario. Posteriormente, se aplicó de forma rápida la cafeína, obteniéndose unos transientes como los que aparecen en la figura 32. Dicha figura muestra 2 trazos representativos de un transiente fluorescente inducido por cafeína, en una célula control (trazo negro) y en una célula tratada con NPY (trazo azul). Después del tratamiento con NPY, el contenido de Ca^{2+} del RS se encontraba aumentado.

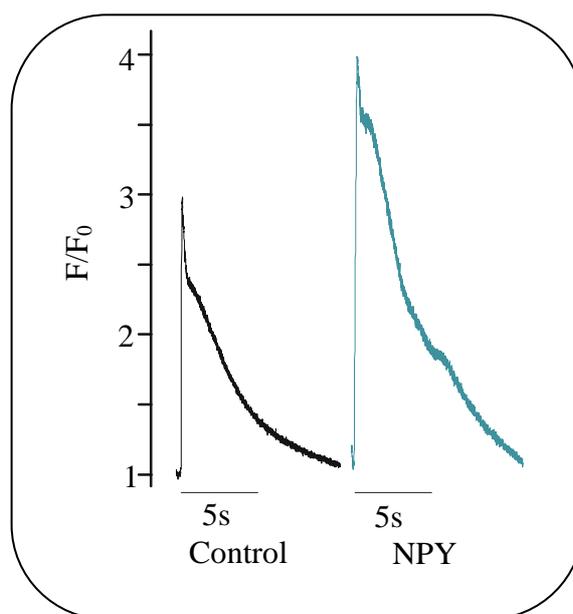


Figura 32. Trazos de $[Ca^{2+}]_i$ evocados por la cafeína. Ejemplos de trazos fluorescentes obtenidos como respuesta a la aplicación rápida de cafeína 10 mM en una célula control (trazo negro) y en una célula tratada un minuto con NPY (trazo azul).

Los datos medios del pico máximo de fluorescencia (F/F_0), obtenidos en 9 células controles y en 8 células tratadas con NPY fueron de $3,31 \pm 0,36$ y $4,42 \pm 0,34$, respectivamente ($p < 0,05$). Dichos datos están representados en la figura 33A, donde de nuevo puede apreciarse el aumento en el contenido de Ca^{2+} del RS, después de la aplicación de NPY.

También se estudió la constante de tiempo de relajación, del transiente fluorescente inducido por la cafeína (figura 33B). Sin embargo, no se observaron variaciones significativas con respecto al control ($1853,51 \pm 543,51$ ms para el control y $1893,77 \pm 478,47$ ms para las células tratadas con NPY), indicando que la actividad del intercambiador Na^+/Ca^{2+} no resulta alterada por el NPY.

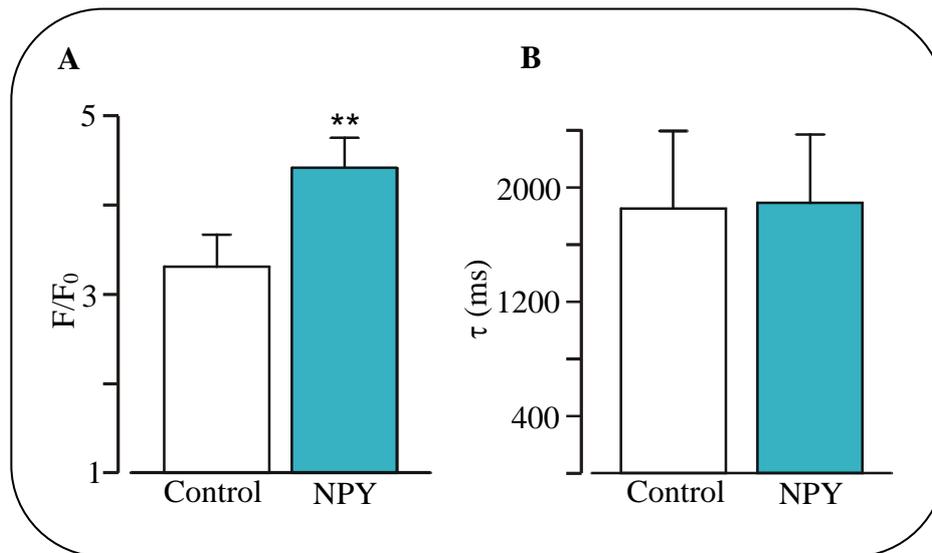


Figura 33. El NPY aumenta la carga de Ca^{2+} del RS de células ventriculares. A. Gráfico de barras correspondiente al transiente fluorescente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (F/F_0) inducido por la cafeína. **B.** Gráfico de barras que representa la constante de tiempo de relajación del transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (τ , ms), después de la aplicación rápida de cafeína. Las barras blancas representan los valores medios \pm EEM obtenidos de 9 células controles y las barras azules representan los valores medios \pm EEM de 8 células tratadas con NPY. ** $p < 0,01$.

4.1.1.2. EFECTO DE NPY (100 nM) SOBRE LOS TRANSIENTES LOCALES DE CALCIO (SPARKS DE Ca^{2+})

Hasta el momento, se ha estudiado uno de los factores que podrían estar implicados en el aumento del transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$; la habilidad del RS para almacenar mayor cantidad de Ca^{2+} , (parámetro que podría explicar, en parte, la variación del transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cuando se administra NPY).

Sin embargo, no hay que olvidar que el transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el sumatorio temporal y espacial de sus unidades elementales, los *sparks* de Ca^{2+} . Por tanto, variaciones en las características de los *sparks* de Ca^{2+} influirán en la magnitud del transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este es el motivo que nos impulsó a investigar los *sparks* espontáneos de Ca^{2+} .

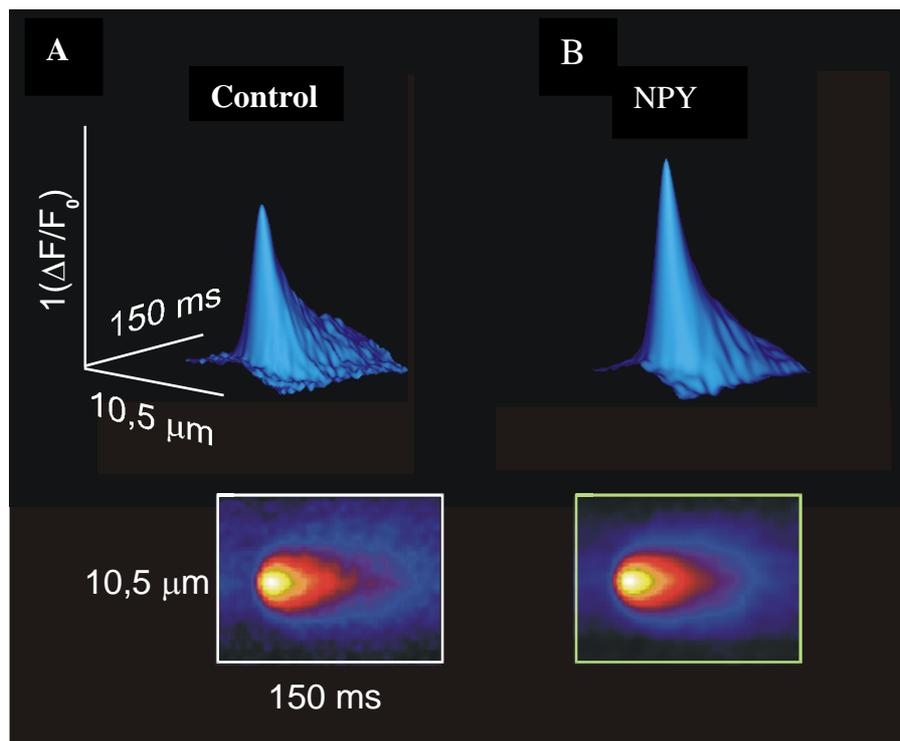


Figura 34. El NPY modifica la amplitud de los *sparks* de Ca^{2+} . Representación de los valores medios de 402 *sparks* de Ca^{2+} registrados en 12 células control (A) y de 434 *sparks* de Ca^{2+} procedentes de las mismas células después de la aplicación de NPY (B). Las imágenes se obtuvieron mediante barrido de línea. La proyección tridimensional de cada imagen se muestra en la parte superior de la figura. La señal fluorescente (F) se normalizó con respecto a la señal de base (F_0).

Los resultados se muestran en la figura 34 donde se puede ver una imagen de la media de los *sparks* de Ca^{2+} , obtenidos por barrido de línea, y registrados en miocitos cardíacos antes (figura 34, panel A abajo) y después (figura 34, panel B abajo) del tratamiento con NPY 100 nM. La proyección tridimensional de cada imagen se muestra en la parte superior de la figura y aporta una imagen más clara de la media de la intensidad fluorescente de los *sparks* de Ca^{2+} , antes (figura 34, panel A arriba) y después (figura 34, panel B arriba) de la aplicación de NPY. Resulta claro que la intensidad fluorescente de los *sparks* de Ca^{2+} aumenta en la presencia de NPY.

En la figura 35A, se presenta el diagrama de barras correspondiente a la media de la amplitud máxima de los *sparks* de Ca^{2+} , antes (barra blanca) y después (barra azul) de la perfusión con NPY. En ella, se observa que el NPY aumentó la amplitud de forma significativa ($p < 0,001$) en 12 células, siendo los valores medios de máxima fluorescencia (representados como F/F_0) de $1,36 \pm 0,01$ en 402 *sparks* de Ca^{2+} , y valores de $1,52 \pm 0,01$ en 434 *sparks* de Ca^{2+} , después de la perfusión con NPY.

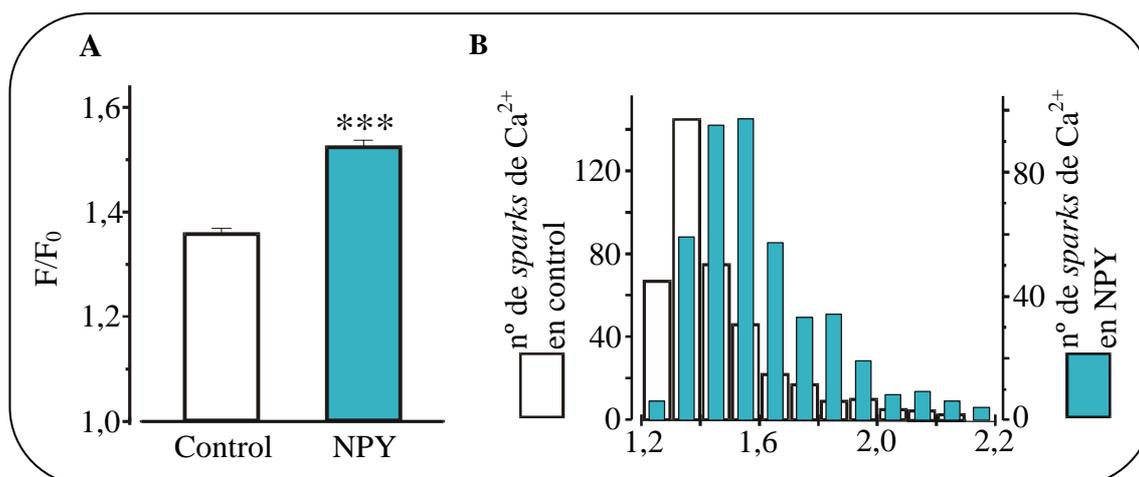


Figura 35. El NPY aumenta la amplitud de los sparks de Ca^{2+} . A. Representación de la media del máximo de fluorescencia de los sparks de Ca^{2+} (expresado como F/F_0) antes (barra blanca, $n=402$) y después (barra verde, $n=434$) de la perfusión de NPY. B. Histograma de frecuencia que representa la amplitud de los sparks de Ca^{2+} en control (barras blancas) vs. NPY (barras azules). *** $p < 0,001$.

En la figura 35B aparece representado el histograma de frecuencias. Este tipo de diagramas distribuye los sparks de Ca^{2+} en poblaciones homogéneas, tomando como factor determinante la amplitud de cada uno. Después del tratamiento con NPY, se apreció un desplazamiento de la población de sparks de Ca^{2+} hacia amplitudes más elevadas. Así por ejemplo, la mayoría de los sparks de Ca^{2+} , en condiciones control, presentaron una amplitud (F/F_0), aproximada, de entre 1,3 y 1,4, mientras que después de la aplicación de NPY, la mayor parte de los sparks de Ca^{2+} tuvieron amplitudes (F/F_0) que oscilaron entre 1,5 y 1,6.

Ya se ha comentado, anteriormente, que los sparks de Ca^{2+} son transientes localizados de Ca^{2+} (figura 21B) y como tales se puede analizar en ellos la constante de tiempo de relajación y la dispersión espacial media del mismo. La constante de tiempo de relajación se obtuvo ajustando la fase de caída de los sparks de Ca^{2+} a una función exponencial simple y la anchura media se ajustó a una función de Gauss. Ninguno de los dos parámetros sufrió variaciones después de la perfusión con NPY (figura 36A y B). De hecho, los valores medios para la constante de tiempo de relajación fueron de $24,20 \pm 1,72$ ms en control ($n=317$) y de $24,11 \pm 1,43$ ms ($n=330$) después de la aplicación de NPY. Los valores medios de la dispersión espacial fueron de $0,87 \pm 0,03$ μm y $0,82 \pm 0,03$ μm para el control ($n=254$) y después de la aplicación de NPY ($n=276$), respectivamente.

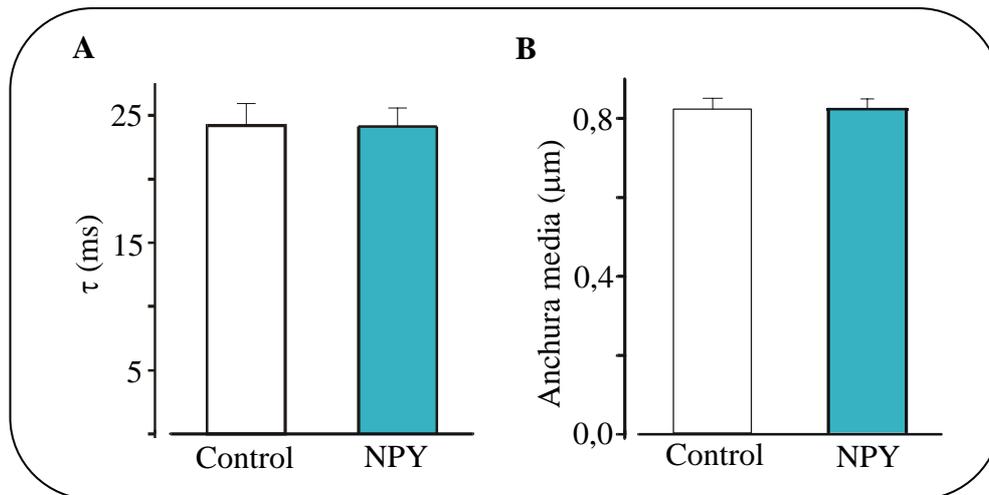


Figura 36. El NPY no modifica la constante de tiempo de relajación ni la anchura media de los sparks de Ca^{2+} . **A.** Representación de los valores medios de la constante de tiempo (τ) en control (n=317) y después de la aplicación de NPY (n=330). **B.** Gráfico de barras donde se muestran los valores medios de dispersión espacial media, antes (n=254) y después de la perfusión de NPY (n=276). Las barras blancas representan los valores medios para el control y las barras azules representan los valores medios después del tratamiento con NPY.

Según los resultados obtenidos, parece claro que el aumento del transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducido por el NPY, está directamente relacionado con el aumento de la amplitud de los sparks de Ca^{2+} . Sin embargo, no se puede obviar que la actividad de los RyRs podría resultar modificada por el NPY. Es decir, cabe la posibilidad de que los sparks de Ca^{2+} tuvieran amplitudes más elevadas y que además se liberaran en mayor número (por posibles variaciones en la probabilidad de apertura del RyR). Para comprobar si esto era así o no, se realizaron estudios donde se midió la ocurrencia de sparks espontáneos de Ca^{2+} en ausencia y presencia del NPY.

En la figura 37A se muestran imágenes representativas de un miocito, antes (figura 37A, panel superior) y después de la aplicación de NPY (figura 37A, panel inferior). La liberación de sparks espontáneos de Ca^{2+} es mayor tras la aplicación de NPY.

Los valores medios de frecuencia (expresados como nº de sparks de $\text{Ca}^{2+}/\text{mm}\cdot\text{s}$) son $0,10 \pm 0,01$ en condiciones control y $0,15 \pm 0,02$, en presencia de NPY (n=12). Dichos valores se representan en la figura 37B, que muestra un aumento significativo ($p < 0,01$) en la ocurrencia de sparks espontáneos de Ca^{2+} , en presencia de NPY.

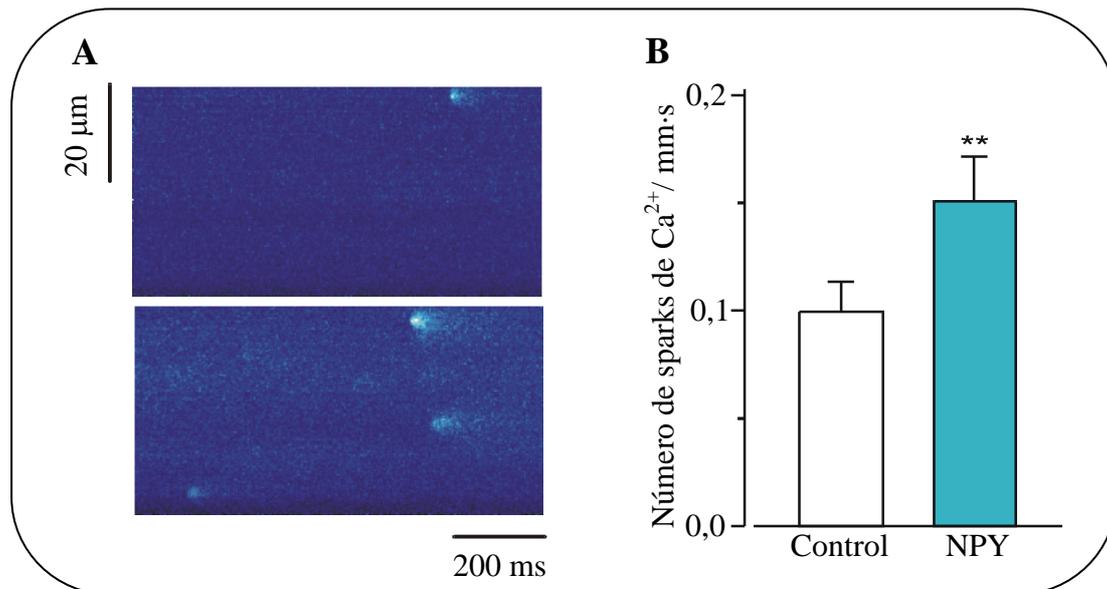


Figura 37. La frecuencia de los sparks de Ca^{2+} aumenta después del tratamiento con NPY. A. Imágenes obtenidas por barrido de línea que muestran la frecuencia de *sparks* de Ca^{2+} espontáneos, en situación control (panel superior) y después de la perfusión de NPY (panel inferior). **B.** El diagrama de barras muestra la frecuencia de los *sparks* de Ca^{2+} , medidos en 12 células, antes (barra blanca) y después (barra azul) del tratamiento con NPY. ** $p < 0,01$.

En resumen, los resultados muestran que el NPY **aumenta la amplitud del transiente** global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y **acelera su cinética de relajación**. Dichas variaciones de las características del transiente, podrían explicarse por un **aumento en la carga del RS**, un **aumento de la amplitud de los sparks** de Ca^{2+} , así como por el **incremento de frecuencia** de los mismos. Todo ello, en conjunto, influirá en el **aumento del % de la contracción**, observado después de la aplicación de NPY. Sólo quedaba pendiente estudiar si en efecto del NPY sobre la contracción estaba también implicada la I_{CaL} . Sin embargo, debido a la extensión de los resultados obtenidos en este sentido, se explicarán en otro apartado de la sección de resultados.

4.1.2. MECANISMO DE TRANSDUCCIÓN IMPLICADOS EN EL EFECTO DE NPY SOBRE EL ACOPLAMIENTO E-C

Los resultados obtenidos hasta el momento proporcionaban una información detallada y lógica del aumento global del transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Sin embargo, nos pareció de sumo interés profundizar en el mecanismo de transducción intracelular por el que el NPY era capaz de producir los efectos, anteriormente citados. Para ello, en primer lugar, se intentó dilucidar el subtipo de receptor de NPY que podía mediar

el efecto, y posteriormente, se profundizó en el estudio de dos cascadas intracelulares, posiblemente implicadas en el aumento del transiente, las proteínas G_i y la cascada de la (PKA).

En este punto es necesario especificar que cuando se utiliza, como herramienta farmacológica la PTX, no se puede afirmar que los mecanismos sean mediados por una proteína G_i , puesto que hoy en día se sabe que la PTX también inhibe las proteínas G_o (Downes y Gautam, 1999). Por ello, durante el desarrollo y discusión de los resultados se hablará de efectos mediados por proteínas G sensibles a PTX.

4.1.2.1. ESTUDIO DEL RECEPTOR DE NPY IMPLICADO

Con el fin de establecer el subtipo de receptor de NPY implicado en el aumento del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ se utilizó un antagonista selectivo de los receptores Y_1 (BIBP 3226, 1 μ M) (Rudolf y cols., 1994) y un antagonista selectivo de los receptores Y_2 (BIIE0246, 1 μ M) (Doods y cols., 1999; Dumont y cols., 2000).

Es conveniente remarcar que en este grupo de experimentos las células se incubaron previamente con el antagonista (1 hora) correspondiente, para asegurar el bloqueo del receptor. Posteriormente, los experimentos se realizaron como en apartados anteriores, es decir, perfundiendo las células durante 1 minuto con NPY 100 nM en presencia del antagonista.

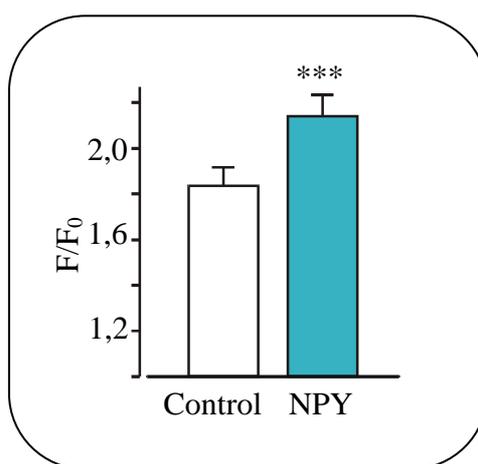


Figura 38. El receptor Y_2 no está implicado en la modificación del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por NPY. El diagrama de barras representa los valores medios de máxima fluorescencia (F/F_0) obtenidos en 10 células ventriculares antes (barras blancas) y después (barras azules) de la perfusión con NPY. Las células fueron tratadas con BIIE0246 una hora antes de comenzar los experimentos. *** $p < 0,001$.

Como se aprecia en la figura 38, el bloqueo del receptor Y_2 , no alteraba el efecto del NPY sobre el pico máximo de fluorescencia. Así, los valores medios del pico máximo de fluorescencia (F/F_0), en 10 células incubadas (1 hora) con BIIE0246, eran de $1,84 \pm 0,08$ antes y $2,14 \pm 0,09$ después del tratamiento con NPY ($p < 0,001$).

Como contrapartida, cuando se bloquearon los receptores Y_1 , con BIBP3226, el NPY no logró mantener el aumento que inducía sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ (figura 39). Por tanto, se puso de manifiesto que la presencia del receptor Y_1 era necesaria, para que el NPY actuara en la señalización de Ca^{2+} intracelular.

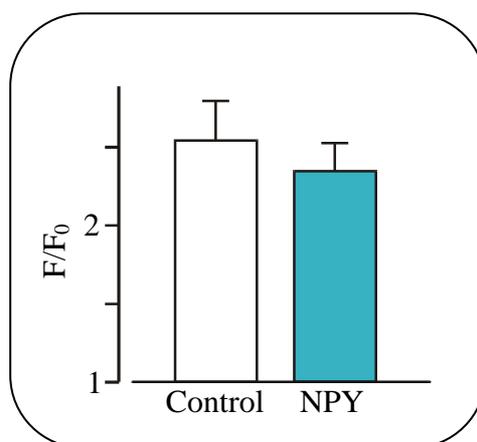


Figura 39. El receptor Y_1 es el responsable del aumento del transiente global de Ca^{2+} inducido por NPY. El diagrama de barras representa los valores medios de máxima fluorescencia (F/F_0) obtenidos en 6 células ventriculares, en ausencia (barra blanca) y en presencia (barra azul) de NPY. Las células fueron tratadas con BIBP3226 una hora antes de comenzar los experimentos.

4.1.2.2. IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G SENSIBLES A PTX EN EL EFECTO DEL NPY SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+}

En la figura 40, se observa que la cascada que sigue el NPY, en la modificación de las características del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, es totalmente independiente de la cascada intracelular que regulan las proteínas G sensibles a PTX. Tal y como se aprecia en dicha figura, después de la incubación con PTX (durante 5 horas), el NPY seguía modificando la amplitud máxima del transiente (F/F_0) desde valores de $2,70 \pm 0,18$ en condiciones control, hasta valores de $3,14 \pm 0,19$, después de la aplicación de NPY ($p < 0,01$).

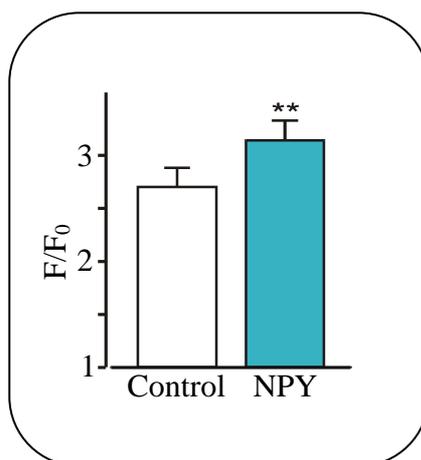


Figura 40. El efecto de NPY es independiente de la cascada de las proteínas G sensibles a PTX. El diagrama de barras representa los valores medios de máxima fluorescencia (F/F_0) obtenidos en 6 células ventriculares antes (barra blanca) y después (barra azul) de la perfusión de NPY. Las células fueron tratadas con PTX 5 horas antes de comenzar los experimentos. ** $p < 0,01$.

4.1.2.3. IMPLICACIÓN DE LA PKA EN EL EFECTO DEL NPY SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+}

Las modificaciones inducidas por el NPY en el acoplamiento E-C eran muy similares a las descritas por otros autores que investigaban fármacos β -adrenérgicos, cuyos mecanismos de acción estaban mediados por la PKA (Valdivia y cols., 1995).

Por tanto, se realizó un bloque de experimentos para comprobar si el NPY compartía el mecanismo de acción de los agonistas β -adrenérgicos. El objetivo fue ver qué efectos tenía el ISO (10^{-7} M), en células incubadas previamente con NPY. Para ello, se diseñaron 2 grupos de trabajo, un grupo control y un grupo que se incubó previamente con NPY (3 horas). Ambos grupos se trataron con ISO y posteriormente se compararon los efectos del péptido en uno y otro grupo.

En la figura 41A se aprecian los resultados obtenidos sobre la amplitud del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$. En primer lugar, se observó que en el grupo control (barras con fondo blanco) el efecto del ISO se correspondía con el ya descrito por otros autores (Valdivia y cols., 1995). Es decir, el agonista β -adrenérgico indujo un aumento significativo ($p < 0,05$) de la fluorescencia máxima. En la misma figura, también se apreció que las células incubadas con NPY (barras con fondo azul) mostraron el mismo efecto de aumento, ya descrito para el péptido cuando la perfusión era tan sólo de un minuto (figuras 28 y 31). Sin embargo, en dichas células

incubadas, el ISO tuvo un efecto diferente que en control, puesto que no fue capaz de aumentar el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ (figura 41A).

En el caso de la constante de tiempo de relajación (figura 41B) y de la contracción (figura 41C) los resultados fueron parecidos. Es decir, el ISO actuó en las células controles (acelerando la constante de tiempo y aumentando la contracción), pero no ocurrió así en las células incubadas con NPY, donde el ISO fue incapaz de potenciar el efecto producido por el NPY.

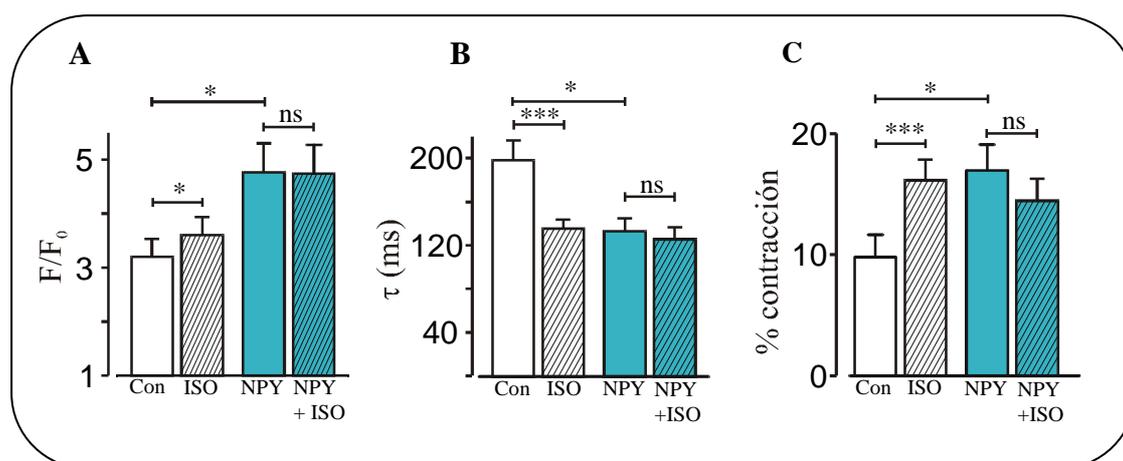


Figura 41. El tratamiento con NPY previene los efectos del ISO 100 nM. **A.** El gráfico de barras muestra los valores medios de la fluorescencia máxima (representada como F/F_0) en 11 células control (barras blancas) antes (barra blanca lisa) y después (barra blanca rayada) del tratamiento con ISO 100 nM. Las barras azules representan los datos medios obtenidos en 6 células incubadas con NPY (3 horas), en ausencia (barra azul lisa) y en presencia (barra azul rayada) de ISO. **B.** Representa la constante de tiempo de relajación (τ , ms) del transiente, obtenido mediante el ajuste del trazo fluorescente a una exponencial simple. Las barras tienen el mismo código de colores que en el panel A para 12 células control y 7 incubadas con NPY. **C.** El diagrama de barras representa los datos medios (en %) de contracción, obtenidos en 8 células control y en 4 células incubadas con NPY. El código de colores es el mismo que en los paneles A y B. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Por tanto, parece evidente, según los resultados presentados, que el NPY media su efecto, sobre la señalización de Ca^{2+} intracelular, a través de su unión al **receptor Y_1** . A su vez, en la cascada intracelular podría verse implicada **la vía de la PKA**, y no así aquellos mecanismos relacionados con las proteínas G sensibles a PTX.

4.2. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Hasta el momento, había quedado demostrado que el NPY aumentaba el transiente de $[Ca^{2+}]_i$, así como la contracción. Estas modificaciones se debían a diversos factores previamente descritos, entre los que se incluyen el aumento de la sensibilidad de los RyRs, la mayor capacidad de llenado del RS y el incremento en la amplitud de las unidades elementales que conforman el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$. Todo ello, explicaba el incremento en el porcentaje de contracción.

Sin embargo, no podía excluirse la variación en las corrientes iónicas implicadas en el PA. Así, podía suceder que la amplitud de I_{CaL} fuera mayor y por tanto, fluyera Ca^{2+} durante un período de tiempo más largo del habitual. Ello contribuiría a la mayor liberación de Ca^{2+} del RS (por el ya mencionado fenómeno de CICR) y, consecuentemente, a un aumento de la contracción.

Por otro lado, tampoco se debía obviar la posibilidad de que el NPY modificara la I_{to} . Una disminución de la misma prolongaría la fase de meseta del PA, dejando, de nuevo, más tiempo para que el Ca^{2+} fluyera al interior de la célula.

Por todo lo expuesto anteriormente, se diseñó un grupo de experimentos destinados a investigar los efectos del NPY sobre la I_{CaL} y otro bloque de experimentos con el fin de analizar sus acciones sobre la I_{to} . En el caso de encontrar alguna acción se profundizaría en los mecanismos de transducción que la mediaban.

4.2.1. EFECTO DEL NPY EN LA CORRIENTE DE CALCIO TIPO L (I_{CaL}) EN CÉLULAS VENTRICULARES DE RATA.

El efecto del NPY sobre la I_{CaL} se estudió, primeramente, en la configuración convencional de célula entera (*whole-cell*). La concentración utilizada fue la misma que para el resto del estudio (100 nM), ya que era a esa concentración a la que otros autores encontraban sus efectos (Millar y cols., 1991; Bryant y Hart, 1996). Una vez obtenido el parche de membrana se esperó un período de 8 minutos para permitir la estabilización de la célula y la diálisis de los componentes de la solución intracelular al interior. Posteriormente, se aisló la corriente, antes y después de la perfusión con NPY. Así, desde un PF de -80 mV se aplicó una rampa hasta -40 mV seguida de la aplicación de pulsos despolarizantes desde -40 hasta $+60$ mV (en intervalos de 10

mV) (figura 43, esquina inferior derecha). La rampa se utilizó, junto con la perfusión de TTX, para inactivar la I_{Na} , presente desde -40 mV hasta -10 mV, aproximadamente

Los resultados obtenidos mostraban que la perfusión de NPY, durante 4 minutos, inducía una marcada disminución de la corriente. En la figura 42 se muestra un experimento representativo, donde se aprecian dos trazos de corriente obtenidos mediante la aplicación de un pulso despolarizante a 0 mV desde un PF de -80 mV. El trazo de la izquierda corresponde al control y el de la derecha corresponde a la máxima amplitud de corriente obtenida después del tratamiento durante 4 minutos con NPY (100 nM). La exposición de los miocitos al NPY produjo un descenso en la máxima amplitud de corriente de -1072 pA a -749 pA.

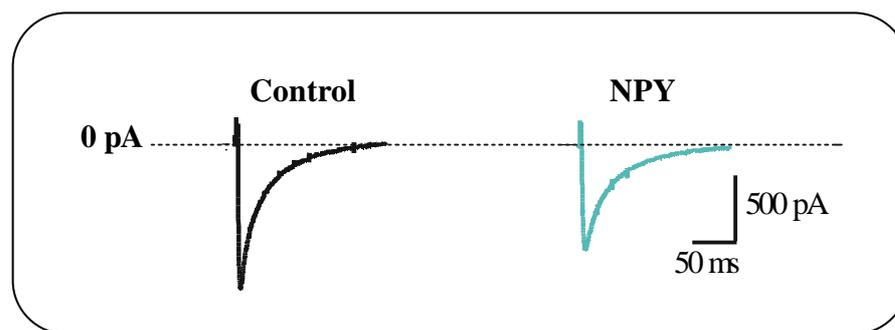


Figura 42. Trazos representativos de I_{CaL} en la configuración de célula entera. Los trazos de I_{CaL} representan la amplitud máxima de corriente, obtenida mediante la despolarización de la membrana desde un PF de -80 mV hasta 0 mV, antes (trazo negro) y después (trazo azul) de 4 minutos de perfusión con NPY. La línea discontinua indica el nivel de corriente cero.

La gráfica de la figura 43 ilustra la relación corriente-voltaje obtenida a partir de 27 células, antes (círculos blancos), y después (círculos azules) de la perfusión de NPY. El NPY indujo una disminución de la corriente que fue significativa desde -30 mV hasta $+50$ mV. Además, el efecto no fue reversible después del lavado. Así lo demostraban los valores medios de amplitud de corriente de 10 miocitos ventriculares de rata ($-1585 \pm 331,04$ pA; $-1122 \pm 193,83$ pA y $-1031 \pm 209,50$ pA, para el control, el NPY y el lavado, respectivamente).

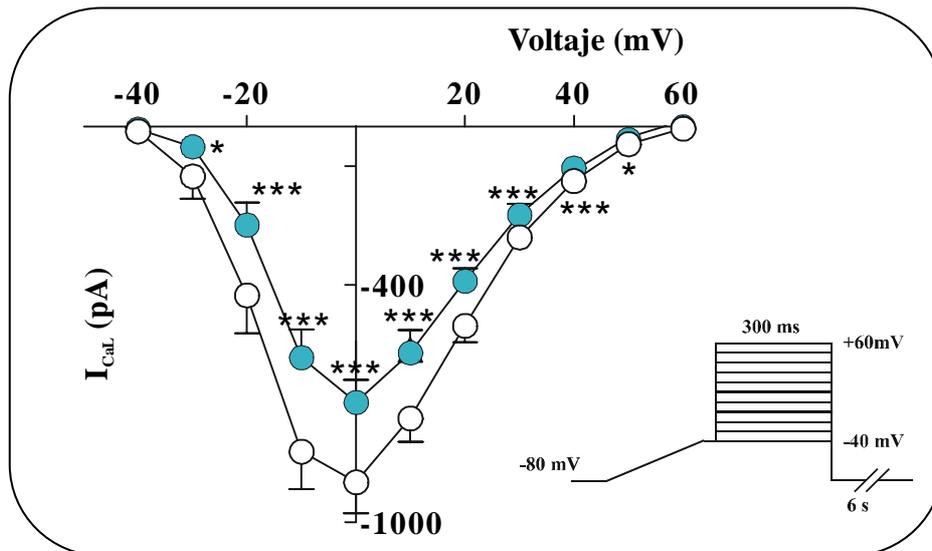


Figura 43. El NPY disminuye la I_{CaL} , en la configuración de célula entera. La gráfica muestra la relación media de la corriente frente al voltaje obtenida en 27 células antes (círculos blancos) y después (círculos azules) de la aplicación de NPY, durante 4 minutos. Los datos se expresaron como la media \pm EEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Aunque muy útil en determinadas condiciones, la configuración de célula entera muestra algunos inconvenientes (ver apartado 3.3.1.1 de Material y Métodos). El principal problema es la diferencia de volumen entre el contenido de la pipeta y el contenido celular. Es decir, el interior de la pipeta contiene una solución con mayor volumen que el citoplasma y por tanto, es capaz de diluir el medio intracelular. Debido a este fenómeno, denominado “fenómeno de lavado” (en inglés, *washout*), algunos componentes celulares necesarios para la modulación intracelular (segundos mensajeros, etc.) o para la activación de un canal, se dializan hasta el punto de la inactivación. Un caso concreto de este fenómeno es la desaparición de la I_{CaL} con el tiempo, lo que en términos electrofisiológicos anglosajones se denomina *run-down* de Ca^{2+} (Belles y cols., 1988; Pelzer y cols., 1990).

Con el fin de descartar que el efecto de NPY sobre la I_{CaL} fuera debido, precisamente, al citado fenómeno de *run-down*, se realizaron unos experimentos para cuantificar la cantidad del mismo que había en nuestras condiciones experimentales. El modo de actuación fue similar al caso anterior, con la salvedad de que no se utilizó NPY. Así, los registros se realizaron a los mismos tiempos: 8 minutos después de la ruptura del sello, 12 minutos (comparables con los 4 min de perfusión con NPY) y 16 minutos (comparables con los 4 minutos de lavado).

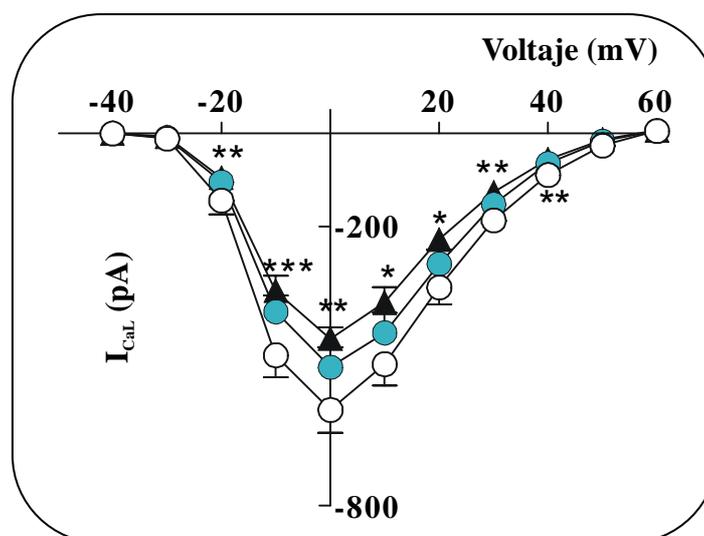


Figura 44. Estudio del *run-down* de calcio. Representación gráfica de la relación amplitud de I_{CaL} -voltaje para 9 miocitos cardíacos de rata. Los registros se realizaron a distintos tiempos después de la ruptura del sello; 8 (círculos blancos), 12 (círculos azules) y 16 minutos (triángulos negros). El NPY no estuvo presente en este grupo de experimentos. Los valores se expresaron como la media \pm EEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (12 min vs. 8 min).

Los resultados obtenidos mostraban, que en ausencia del péptido, se producía una disminución de la I_{CaL} . Los valores medios de la amplitud de I_{CaL} , obtenidos en 9 células, aparecen representados en la figura 44. Los valores de la amplitud de corriente desde -20 mV hasta $+40$ mV fueron significativamente menores cuando el registro se hacía más prolongado en el tiempo. Es decir, la amplitud de la corriente era menor a los 12 y 16 minutos (círculos azules y triángulos negros, respectivamente), que a los 8 minutos (círculos blancos) de la ruptura del sello, presentando valores medios de amplitud máxima de $-593,78 \pm 49,01$ pA a los 8 minutos, $-502,44 \pm 43,52$ pA ($p < 0,01$) a los 12 minutos y $-441,14 \pm 38,38$ pA a los 16 minutos después de la ruptura del sello ($n=9$).

El cálculo aproximado de los porcentajes de disminución de la I_{CaL} por efecto del *run-down* o por efecto del NPY (a 0 mV) inducían a pensar que el efecto de NPY, cuando se utilizaba la configuración de célula entera, estaba amplificado por el fenómeno de *run-down* (figura 45).

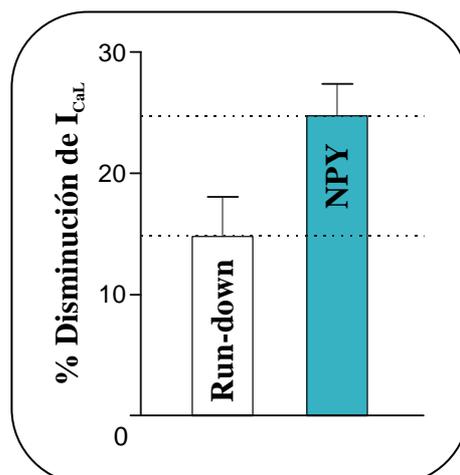


Figura 45. El efecto del NPY sobre la I_{CaL} , en la configuración de célula entera, está sobrestimado debido al *run-down*. La barra blanca representa el % de disminución de la I_{CaL} , de 9 células, debido al *run-down* (registros a los 8 vs. 12 minutos). La barra azul indica el % de disminución de la I_{CaL} cuando se aplicó NPY durante 4 min, con respecto al control (n=26). El espacio delimitado por las líneas discontinuas representa el porcentaje hipotético de efecto que tendría el NPY al suprimir el % de *run-down*.

Los datos preliminares apoyaban la existencia de un efecto del NPY sobre la I_{CaL} . Sin embargo, el efecto en la configuración de célula entera estaba sobrestimado. Se hizo evidente que el uso de ciertos mediadores requeridos para la modulación del canal (ATP, GTP, creatín fosfato y EGTA) (ver apartado 3.2.3.2), no evitaban la disminución de la corriente con el tiempo. Por ello, la única forma que quedaba para demostrar el efecto del NPY sobre la I_{CaL} consistía en la repetición de los experimentos, pero en la configuración de parche perforado. Con esta laboriosa técnica se evitaba la pérdida de componentes citoplasmáticos fundamentales para la activación de las corrientes (Revisión, Tajima y cols., 1996). En esta configuración sólo tienen libre movimiento los iones monovalentes, preferiblemente los cationes, ya que el contacto eléctrico se establece por la formación de poros en la porción de membrana donde se formó el sello y no por la ruptura de la misma (Ver sección de Material y Métodos, figura 22).

Los resultados de este nuevo bloque de experimentos verificaban, indudablemente, que el NPY disminuía la I_{CaL} . El efecto era menos marcado de lo que indicaban los resultados en la configuración de célula entera y más parecido al efecto

que quedaba cuando se sustraía, hipotéticamente, el *run-down* de la I_{CaL} obtenida (figura 45).

En la figura 46 se muestra un experimento típico, donde se representan dos trazos de corriente (a 0 mV), uno en condiciones control (trazo negro) y otro después de 4 minutos de aplicación de NPY (trazo azul). Para esta célula, los valores de amplitud máxima fueron de -937 pA antes y -811 pA después de la aplicación de NPY (100 nM).

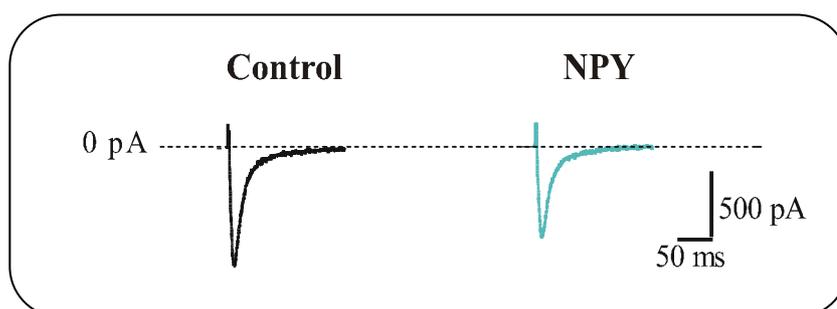


Figura 46. Trazos representativos de I_{CaL} en la configuración de parche perforado. Los trazos de I_{CaL} representan la amplitud máxima de corriente, obtenida mediante la despolarización de la membrana desde un PF de -80 mV hasta 0 mV, antes (trazo negro) y después (trazo azul) de 4 minutos de perfusión con NPY. La línea discontinua indica el nivel de corriente cero.

El mismo efecto de disminución se apreció en 11 células expuestas al péptido tal y como se representa en la figura 47. En la relación corriente-voltaje obtenida antes (círculos blancos) y después (círculos azules) de la perfusión de NPY, se muestra como el péptido indujo una disminución de la corriente que fue significativa ($p < 0,05$; $p < 0,01$) desde -10 mV hasta $+30$ mV.

En conclusión, los resultados demostraban que el NPY es capaz de modular discretamente la I_{CaL} en miocitos ventriculares de rata. En este caso concreto, fue más correcto utilizar la configuración de parche perforado ya que por el contrario el efecto del péptido se veía amplificado debido a la diálisis intracelular sufrida por la célula, cuando la configuración utilizada es la de célula entera.

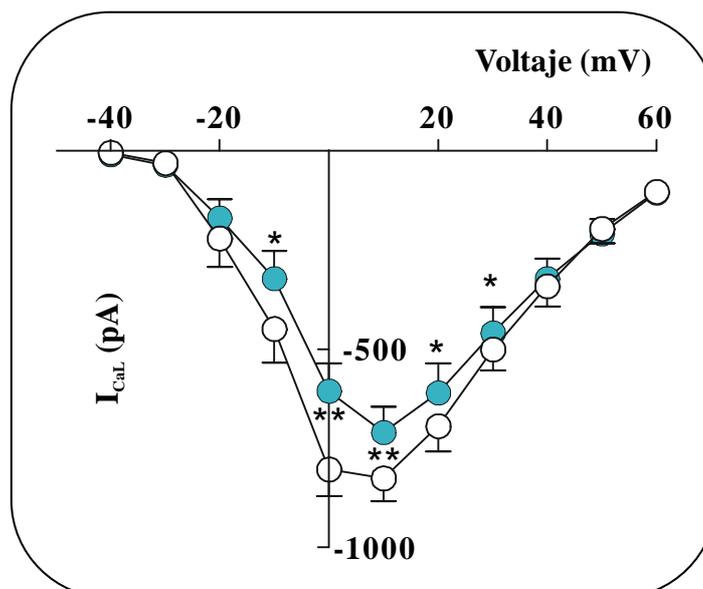


Figura 47. El NPY disminuye la I_{CaL} , en la configuración de parche perforado. La gráfica muestra la relación media de la corriente frente al voltaje obtenida en 11 células antes (círculos blancos) y después (círculos azules) de la aplicación de NPY durante 4 minutos. Los datos se expresaron como la media \pm EEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.2. ESTUDIO DEL RECEPTOR INVOLUCRADO EN EL EFECTO DEL NPY SOBRE LA I_{CaL}

Una vez demostrado que el NPY inducía la disminución de la I_{CaL} , se investigó cuál de los dos principales receptores cardíacos de NPY estaba implicado en el efecto. Para ello, como en ocasiones anteriores, disponíamos de las herramientas farmacológicas adecuadas, los antagonistas selectivos del receptor Y_1 (BIBP3226) y del receptor Y_2 (BIIE0246).

Para la realización de estos experimentos se incubaron las células durante 1 hora con el antagonista y posteriormente, se aisló la I_{CaL} con el mismo protocolo utilizado hasta el momento (figura 43). En este caso, cuando se perfundió la célula con NPY fue en presencia del antagonista estudiado.

El bloqueo del receptor Y_1 anuló los efectos del NPY sobre la I_{CaL} , tal y como se aprecia en la figura 48A, donde las curvas que relacionan la amplitud de corriente en función del voltaje en control (círculos blancos) y después de la aplicación de NPY (círculos azules) se solapaban. De hecho, los valores medios para el pico eran muy

similares, $-1057,66 \pm 137,75$ pA antes y $-1051 \pm 41,92$ pA, después de la aplicación de NPY (n=6).

Asimismo, también se anularon los efectos del NPY sobre la corriente, cuando se bloquearon los receptores Y_2 . En la figura 48B se reflejan las curvas que relacionan la corriente frente al voltaje demostrando que este receptor es necesario para la regulación del canal de Ca^{2+} llevada a cabo por el NPY. Como en el caso anterior, los valores medios de máxima amplitud de I_{CaL} fueron prácticamente iguales, $-1011,20 \pm 163,78$ pA vs. $-1036 \pm 152,60$ pA, para el control y el NPY (n=5), respectivamente.

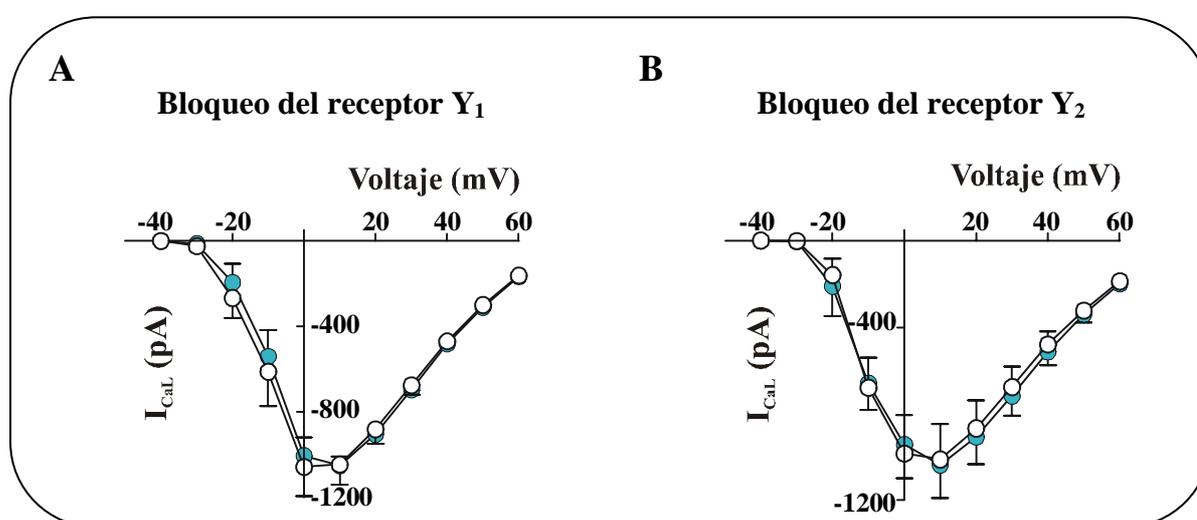


Figura 48. El efecto de NPY sobre la I_{CaL} es inespecífico del subtipo de receptor. A. Representación de la relación de corriente-voltaje cuando se bloquea el receptor Y_1 . **B.** La gráfica muestra la relación de corriente-voltaje, cuando se bloquea el receptor Y_2 . En ambos casos, los círculos blancos representan la curva obtenida en situación control y los azules la curva resultante después de la aplicación de NPY. Durante todo el experimento las células estuvieron expuestas al antagonista objeto de estudio. Los datos se expresaron como la media \pm EEM.

Por tanto, de estos resultados se dedujo que ambos receptores eran imprescindibles en la modulación a la baja de la I_{CaL} por NPY. Además, al parecer, se hacía necesaria la interacción del NPY con los dos receptores, porque cuando uno sólo era el que quedaba libre (por bloqueo del otro) tampoco había efecto.

4.2.3. ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO ANTIADRENÉRGICO DEL NPY

Algunos autores habían descrito que el NPY era capaz de disminuir los niveles de AMP_C citoplasmáticos, previamente aumentados por ISO (Kassis y cols., 1987; Millar y cols., 1988). Si esto era así, quizá el NPY tuviera un mecanismo relacionado con el del ISO. Por ello, se investigó si el NPY era capaz de modular la I_{CaL} previamente estimulada por ISO (1 μM).

Los experimentos se llevaron a cabo en la configuración de parche perforado. La aplicación de ISO (1 μM) indujo un incremento de la amplitud de la corriente de casi el doble de la amplitud del control (figura 49). Aumento que el NPY no fue capaz de modular a la baja. Los valores de amplitud, a 0 mV, de este experimento concreto son de -1000 pA en control, -1603 pA después de la perfusión con ISO y -1652 pA después de la aplicación de ISO y NPY.

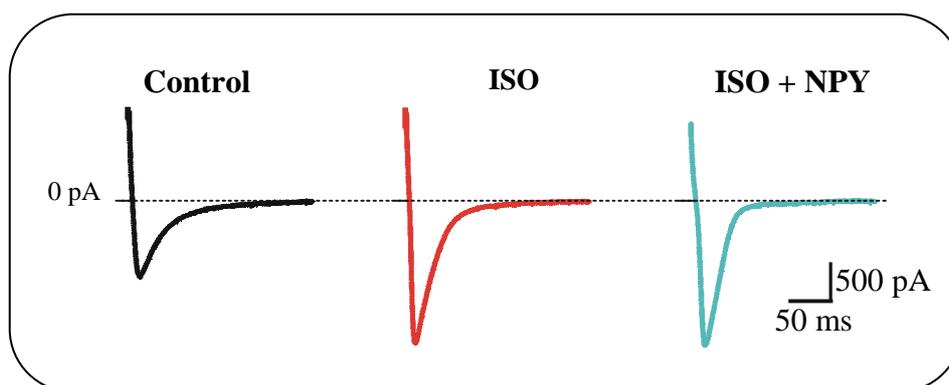


Figura 49. Efecto del NPY (100 nM) cuando la I_{CaL} se estimuló con ISO (1 μM). Los trazos de I_{CaL} representan la amplitud máxima de corriente, obtenida mediante la despolarización de la membrana desde un PF de -80 mV hasta 0 mV, en situación control (trazo negro), cuando la corriente se estimuló con ISO (trazo rojo) y después de 4 minutos de perfusión de NPY (trazo azul). La línea discontinua indica el nivel de corriente cero.

Este mismo resultado se obtuvo en 4 células más. La relación corriente-voltaje registrada a diferentes potenciales test se muestra en la figura 50. El ISO produjo un aumento de la corriente prácticamente a todos los potenciales. La amplitud en el pico de corriente (a 0 mV) aumentó desde $-1014,75 \pm 112,15$ pA, en condiciones control, hasta $-1769 \pm 255,46$ pA después de la aplicación de ISO. Sin embargo, el NPY no modificó la amplitud de corriente previamente estimulada por ISO. El valor medio a la máxima amplitud de corriente fue de $-1708 \pm 245,98$ pA.

Por tanto, en nuestras condiciones experimentales, el NPY no es capaz de modular la I_{CaL} una vez que ésta ha sido estimulada con ISO.

Como resumen general de esta sección se podría decir que el NPY induce una disminución de la I_{CaL} y que para ello le es indispensable la interacción tanto con el receptor Y_1 como con el receptor Y_2 .

Por otro lado, también quedaba descartado que la I_{CaL} fuera responsable del aumento del transiente de $[Ca^{2+}]_i$ demostrado anteriormente.

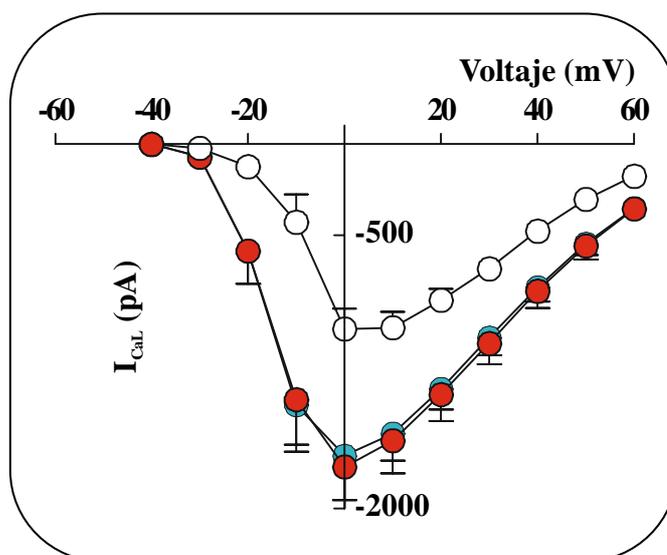


Figura 50. El NPY no modifica la I_{CaL} previamente estimulada con ISO. La gráfica muestra la relación media de la corriente frente al voltaje obtenida en 4 células en condiciones control (círculos blancos), durante la aplicación de ISO (círculos rojos) y después (círculos azules) de la aplicación de NPY + ISO durante 4 minutos. Los datos se expresaron como la media \pm EEM.

4.2.4. ESTUDIO DE LA CORRIENTE TRANSITORIA DE POTASIO SENSIBLE A 4-AP ($I_{to(4-AP)}$) EN CÉLULAS VENTRICULARES DE RATA

Fueron varias las incógnitas que se querían resolver con el estudio de la I_{to} . En primer lugar, parecía interesante esclarecer si esta corriente estaba implicada en el efecto del NPY sobre la señalización de $[Ca^{2+}]_i$. Aunque la I_{CaL} , no estuviera contribuyendo directamente al aumento del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, era factible su contribución indirecta por la disminución de la corriente repolarizante más importante presente en la rata, la I_{to} , lo que permitiría mayor tiempo de flujo del Ca^{2+} a través de su canal.

En segundo lugar, se planteó otra hipótesis no menos interesante que la anterior basada en la dualidad de efectos, mediados por distintos subtipos de receptores de NPY. Fue el grupo de Millar, (1991) quién propuso por primera vez esta teoría. En sus estudios afirmaron que el efecto inotrópico negativo que se observaba en el corazón de rata parecía debido a un aumento de la $I_{to(4-AP)}$ inducido por NPY, pero cuando ésta era bloqueada con 4-AP, se desenmascaraba un efecto inotrópico positivo asociado con la activación de la I_{CaL} . Posteriormente, con la aparición de agonistas específicos el mismo grupo describió que dichos efectos contrapuestos eran mediados por dos receptores distintos (M_CDermott y cols., 1997), el Y_1 para los efectos positivos y el Y_2 para los efectos negativos. Con estos antecedentes y habiendo comprobado anteriormente que el receptor Y_1 estaba implicado en el aumento de la contracción era interesante comprobar qué efecto encontrábamos en nuestras condiciones experimentales sobre la $I_{to(4-AP)}$ y qué receptor mediaba dicho efecto.

Dado que en la literatura sólo aparecía un estudio donde se analizaba el efecto del NPY sobre la I_{to} , en miocitos ventriculares de rata (Millar y cols., 1991), se optó por comprobar si en nuestras condiciones experimentales había algún efecto del NPY sobre la I_{to} . De ser así, parecía interesante profundizar en los mecanismos intracelulares implicados en dicho efecto.

Los estudios se centraron en el análisis de la $I_{to(4-AP)}$ ya que es la corriente esencial en la fase 1 de repolarización y era en ella donde se habían descrito los efectos de NPY. Para su obtención se sustrajo la corriente obtenida antes y después de la aplicación de 4-AP.

La primera aproximación experimental se realizó en la configuración de parche perforado. La I_{to} se obtuvo, tal y como se indicó en el apartado de Material y Métodos, mediante la aplicación de pulsos despolarizantes, desde -40 hasta $+60$ mV, en intervalos de 10 mV (de 1 s de duración), desde un potencial de fijación de -80 mV (figura 51, derecha abajo).

En la figura 51 se muestran los resultados obtenidos en 10 miocitos aislados del ápex de corazones de rata (en esta zona la I_{to} es más homogénea que en el resto del corazón) (Bénitah y cols., 1993). La aplicación de 100 nM de NPY, durante 4 minutos, no modificó la densidad de corriente, a ninguno de los potenciales test. Los valores medios de amplitud, obtenidos al potencial de $+60$ mV, fueron de $1465,5 \pm 214,61$ pA y de $1489,0 \pm 208,73$ pA para el control y para el NPY, respectivamente.

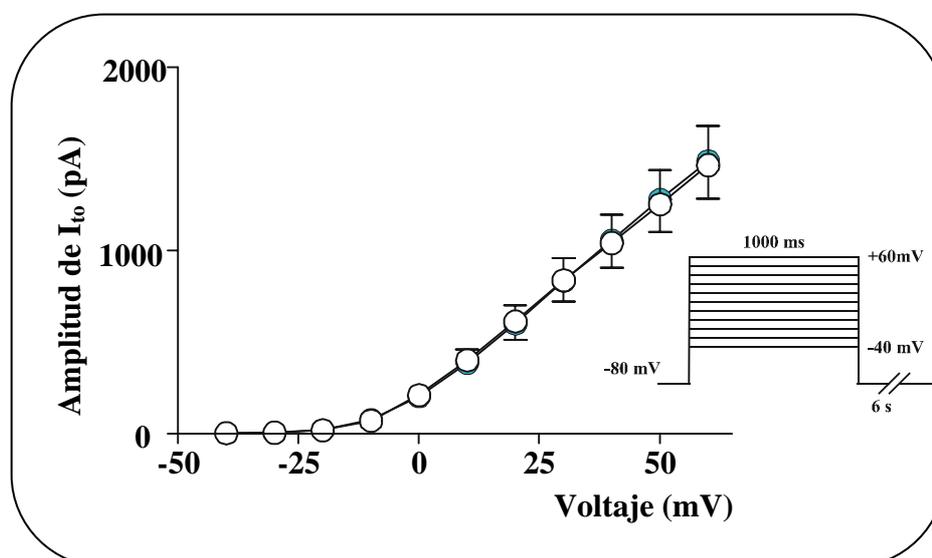


Figura 51. La perfusión con NPY 100 nM, durante 4 minutos, no modifica la I_{to} . Representación de la relación de corriente-voltaje en condiciones control (círculos blancos, $n=10$) y después de la perfusión, durante 4 min con NPY (círculos azules, $n=10$).

Algunos autores habían descrito ausencia de efectos directos sobre los canales de Ca^{2+} (Bénitah y Vassort, 1999) y K^+ (Shimoni y cols., 2000; Bénitah y cols., 2001), tanto para aldosterona (Bénitah y Vassort, 1999; Bénitah y cols., 2001) como para la insulina (Shimoni y cols., 2000). Sin embargo, después de mantener a las células en contacto con las sustancias un tiempo más prolongado observaron variaciones en la magnitud de las corrientes.

Por este motivo, en este lote de experimentos, se incubaron las células con NPY a la concentración de 100 nM, a distintos tiempos (de 3 a 6 horas). De este modo, se demostraría si no había efecto o si por el contrario, no se había visto, porque

tardaba en mostrarse, debido al lento desarrollo de las cascadas intracelulares que lo mediaban.

De nuevo, se utilizaron células procedentes de la zona apical del corazón (Bénitah y cols., 1993). Las células se dividieron en dos grupos, un grupo control y otro grupo al que se trató con NPY (100 nM) durante un tiempo mínimo de 3 horas y un tiempo máximo de 6 horas. Para evitar el error debido a los diferentes tamaños celulares, la amplitud de corriente en cada célula fue normalizada por su capacitancia de membrana, C_m , que está en relación con la superficie ($1\mu\text{F}/\text{cm}$, Kleiman y Houser, 1988) y es más exacta que la medición a través del microscopio, que despreciaría las invaginaciones de la membrana. Por tanto, los resultados de este lote de experimentos fueron expresados en términos de densidad de corriente.

Finalmente, tras la realización de este ensayo, el NPY demostró tener un efecto modulador de la I_{to} . En la figura 52A, se muestran ocho trazos de I_{to} obtenidos al despolarizar la membrana, desde un PF de -80 mV , a distintos potenciales test, entre -10 mV y $+60\text{ mV}$. El panel de la izquierda muestra los trazos de una célula control y el panel de la derecha los trazos de una célula tratada con NPY. Tal y como se observa en la figura, la célula tratada con NPY presenta una I_{to} de mayor amplitud que la corriente aislada de una célula control.

Para obtener la amplitud de la $I_{to(4\text{-AP})}$ se trató a la célula con 4-AP (3 mM). Así, una vez registrada la corriente total, se repitió el mismo protocolo pero perfundiendo con 4-AP, a una concentración de 3 mM. Después del tratamiento con 4-AP (figura 52B) la I_{to} disminuyó drásticamente, tanto en la célula control (figura 52B, izquierda) como en la célula tratada con NPY (figura 52B, derecha). Posteriormente, la $I_{to(4\text{-AP})}$ se obtuvo mediante la sustracción de los trazos obtenidos en ausencia (figura 52A) y en presencia de 4-AP (figura 52B). La figura 52C muestra que la $I_{to(4\text{-AP})}$ de la célula tratada con NPY (figura 52C, derecha) es mayor que la de la célula control (figura 52C, izquierda).

Resultados similares se obtuvieron en 19 células control y 21 células tratadas con NPY (3-6 horas). De este modo, se obtuvieron valores medios de densidad de I_{to} , a $+60\text{ mV}$, de $24,82 \pm 2,43\text{ pA/pF}$ para las células control y de $37,89 \pm 2,54\text{ pA/pF}$ para las células incubadas con NPY ($p < 0,001$). La relación densidad de corriente-

voltaje se representa en la figura 53, donde se aprecia que los valores de I_{to} son mayores a todos los potenciales test utilizados, en las células tratadas con NPY.

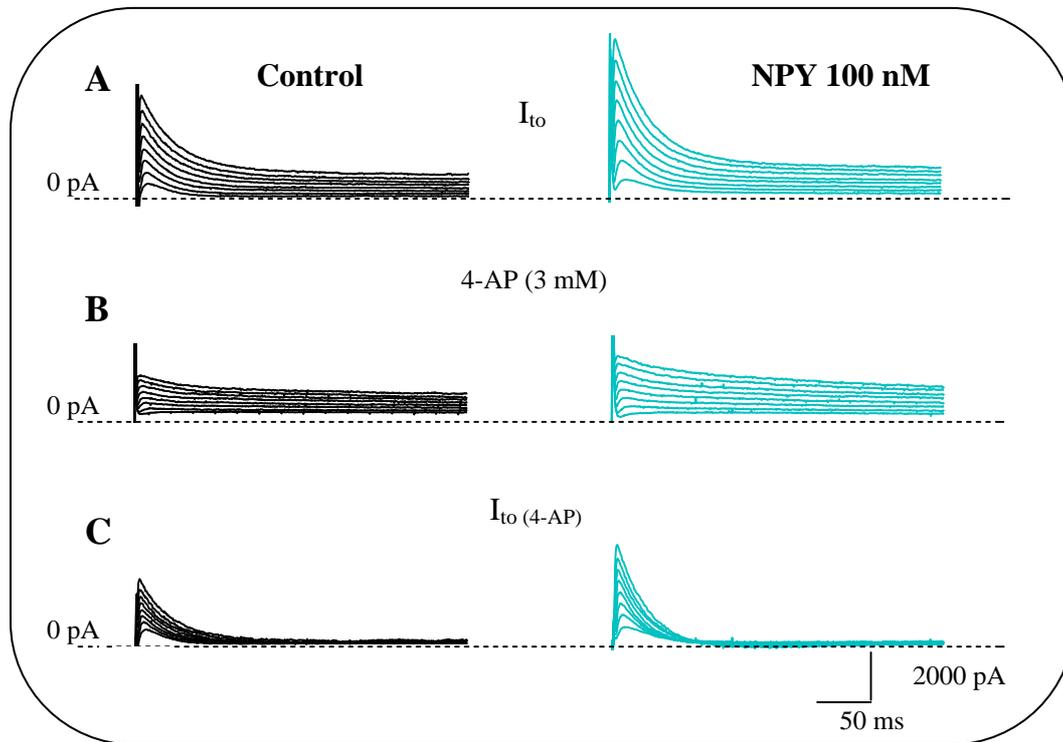


Figura 52. La incubación con NPY 100 nM (3-6 horas) modifica la I_{to} y la $I_{to(4AP)}$ en miocitos apicales de corazones de rata. **A.** Trazos representativos de la I_{to} (desde -10 mV hasta $+60$ mV) de una célula control (panel izquierda) y una incubada con NPY (panel derecha). **B.** Trazos de I_{to} registrados en las mismas células (control y tratada con NPY) después de la aplicación de 4-AP 3 mM. **C.** Trazos de $I_{to(4-AP)}$ obtenidos mediante la sustracción de la corriente antes (panel A) y después (panel B) de la aplicación de 3 mM de 4-AP.

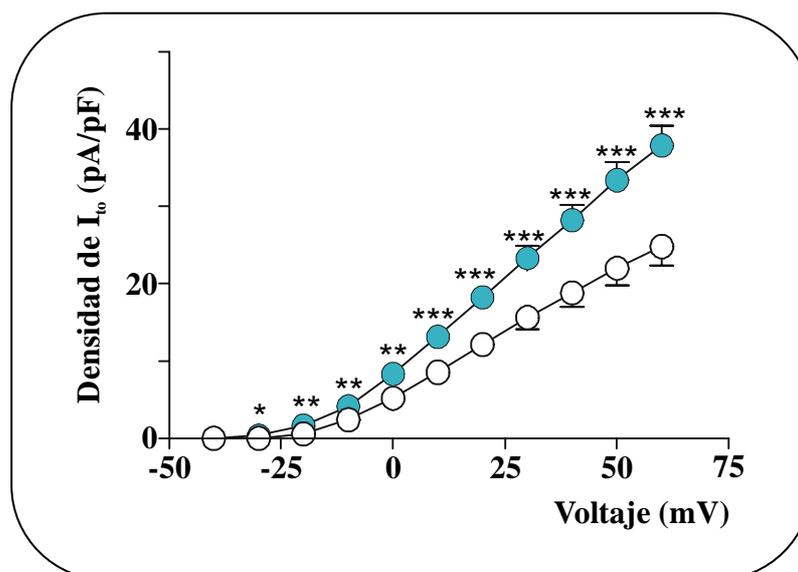


Figura 53. La incubación con 100 nM de NPY (3-6 horas) aumenta la I_{to} . La gráfica representa la relación densidad de corriente frente al voltaje obtenida en 19 células controles (círculos blancos) y en 21 células incubadas con NPY (círculos azules). Los datos se representan como la media \pm EEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

La representación de los valores medios de densidad de I_{to} (4-AP) frente al voltaje (figura 54) también demostró que la incubación de las células con NPY incrementaba, de forma significativa, los valores de densidad de corriente a todos los potenciales usados, siendo los valores medios de densidad, a +60 mV, de $17,06 \pm 1,99$ pA/pF, en las células controles (n=17) y de $25,21 \pm 2,57$ pA/pF, para las células tratadas con NPY (n=16) ($p < 0,01$).

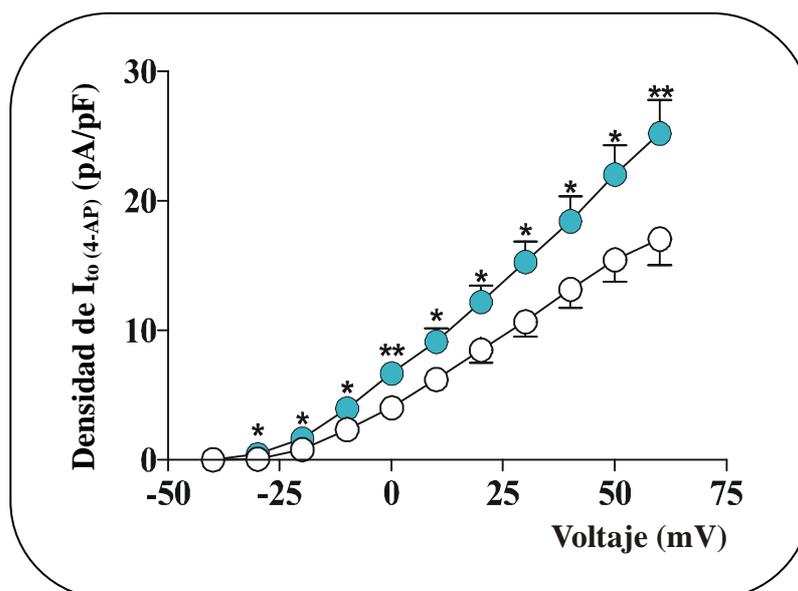


Figura 54. La incubación con NPY 100 nM modifica la I_{to} (4-AP). La gráfica muestra la densidad de corriente-voltaje obtenida en 17 células controles (círculos blancos) y en 16 células incubadas con NPY (círculos azules). Los valores se representan como la media \pm EEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.4.1. CURVA DOSIS-RESPUESTA

Hasta el momento, se había demostrado que la incubación durante un período de 3 a 6 horas con NPY 100 nM incrementaba la densidad de la I_{to} (4-AP). Los experimentos comenzaron a realizarse a la concentración que había resultado más efectiva a otros autores (Bryant y cols., 1991; Bryant y Hart, 1996) y que además demostraba efectos estimulantes de la I_{to} (Millar y cols., 1991). Ahora bien, era interesante comprobar si el efecto encontrado, bajo nuestras condiciones experimentales, se manifestaba de forma dosis dependiente o no. Por ello, se optó por realizar el mismo protocolo utilizado para la concentración seleccionada previamente (100 nM), utilizando las concentraciones de 1 nM, 10 nM, 100 nM y 500 nM.

En este lote de experimentos se obtuvo la curva que se muestra en la figura 55. En ella, cada punto representa el porcentaje de aumento de los valores de densidad a +60 mV, para cada concentración. La mínima concentración a la que el NPY manifestaba su efecto era la de 1 nM, evidenciándose el máximo efecto a la concentración de 500 nM.

Del ajuste no lineal de la curva (Graph Pad software, versión 3.0) se dedujo que en nuestras condiciones experimentales, la concentración eficaz 50 (CE_{50}) era de 10 nM y el porcentaje máximo de aumento de la $I_{to(4-AP)}$ a la concentración con máximo efecto (E_{max}) era de un 55 %.

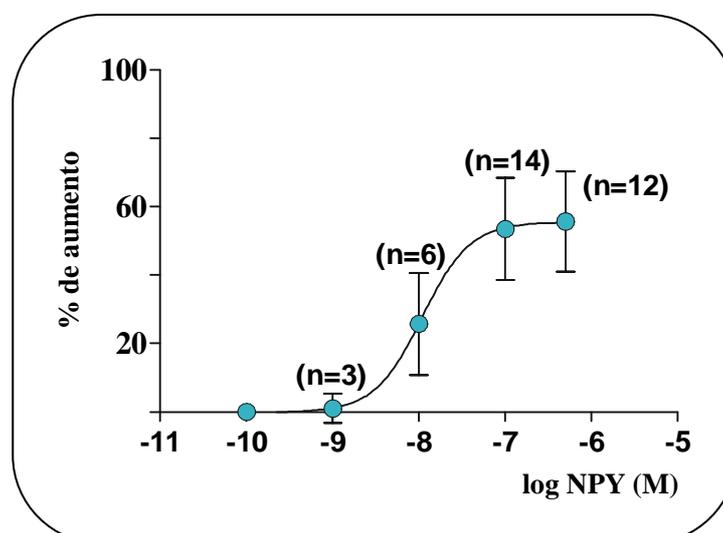


Figura 55. El aumento inducido por el NPY, en la $I_{to(4-AP)}$ es dependiente de la concentración. La gráfica muestra el porcentaje de aumento de la $I_{to(4-AP)}$ sobre la corriente basal. Cada punto representa los valores medios (a +60 mV) de $I_{to(4-AP)}$, obtenidos después de la incubación del péptido a diferentes concentraciones. Los números entre paréntesis indican el número de células utilizadas para cada concentración. Los resultados se expresaron como la media \pm EEM.

4.2.5. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN IMPLICADO EN EL AUMENTO DE LA $I_{to(4-AP)}$ POR NPY

Llegados a este punto, en el que habíamos demostrado la modulación al alza de la $I_{to(4-AP)}$ cuando se aplicaba NPY, parecía interesante ahondar en las cascadas intracelulares que mediaban dicho efecto.

En los últimos años y gracias al desarrollo de los antagonistas selectivos de los receptores de NPY, se han identificado los subtipos específicos que median los efectos típicamente atribuidos al NPY (Michel y cols., 1998; Nie y Selbie, 1998; Abrahamsson, 2000; Jacques y cols., 2000; Prieto y cols., 2000). Por este motivo, el primer objetivo que se planteó fue la investigación del receptor o receptores implicados en el efecto. Posteriormente, se estudió si algunos mediadores de ciertas cascadas intracelulares (las proteínas G_i y la PKA) estaban implicadas en el efecto del NPY sobre la $I_{to(4-AP)}$.

4.2.5.1. ESTUDIO DEL RECEPTOR DE NPY IMPLICADO

Con el fin de averiguar el subtipo de receptor implicado en el aumento de la $I_{to(4-AP)}$, tras la incubación de los miocitos apicales de rata, se utilizó un antagonista selectivo de los receptores Y_1 (BIBP 3226) (Rudolf y cols., 1996) y un antagonista específico de los receptores Y_2 (BIIE0246) (Doods y cols., 1999; Dumont y cols., 2000).

Para la realización de este bloque de experimentos, las células se incubaron durante una hora con el antagonista correspondiente (a la concentración 1 μ M), para asegurar el bloqueo del receptor. Transcurrido ese tiempo, se añadió el NPY y siempre en presencia del antagonista se incubaron las células un mínimo de 3 horas, tal y como se había hecho en apartados anteriores.

En la figura 56 se aprecia la curva densidad de $I_{to(4-AP)}$ frente al voltaje de dos grupos de miocitos apicales de rata. Uno de ellos ($n=8$), incubado sólo con el antagonista BIBP3226 (círculos blancos) y el otro ($n=10$), incubado primero con el antagonista y después durante 3 horas, como mínimo, con BIBP3226 y con NPY (círculos azules). Tal y como se observa en dicha figura, el efecto no podía estar mediado por los receptores Y_1 puesto que al ser bloqueados, seguía apareciendo el efecto, incluso, de forma más marcada que en su ausencia (figura 54). El NPY era

capaz de aumentar la densidad de $I_{to(4-AP)}$, incluso en presencia del antagonista Y_1 . Los valores fueron significativos desde -10 mV hasta $+60$ mV siendo los valores medios, a $+60$ mV, de $16,65 \pm 1,80$ pA/pF para las 8 células incubadas con el antagonista del receptor Y_1 y de $26,27 \pm 1,50$ pA/pF para las 11 células incubadas tanto con BIBP3226 ($1\mu\text{M}$) como con NPY 100 nM ($p < 0,001$).

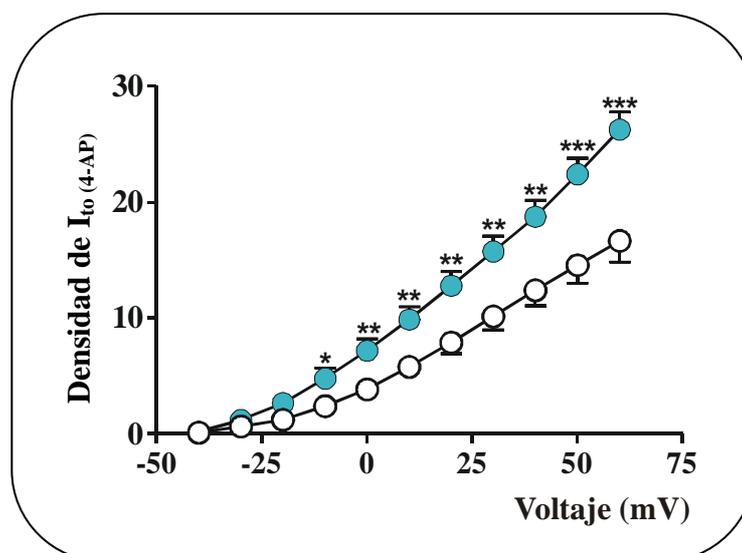


Figura 56. El receptor Y_1 no está implicado en el efecto del NPY en la $I_{to(4-AP)}$. La gráfica muestra la densidad de corriente-voltaje de 8 células tratadas con el antagonista Y_1 (círculos blancos) y 10 células tratadas con el antagonista y con NPY (círculos azules). Los datos se expresan como la media \pm EEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por el contrario, cuando se bloquearon los receptores Y_2 , con el antagonista BIIE0246 a la concentración de $1\mu\text{M}$, el NPY no fue capaz de inducir el aumento sobre la $I_{to(4-AP)}$, previamente descrito. La curva densidad de corriente-voltaje se muestra en la figura 57 donde se aprecian densidades de corriente similares en 14 células controles (incubadas con BIIE0246) (círculos blancos) y en 8 células incubadas con NPY (y en presencia de BIIE0246). Por tanto, se puso de manifiesto que la presencia del receptor Y_2 era necesaria para que el NPY modulara la $I_{to(4-AP)}$.

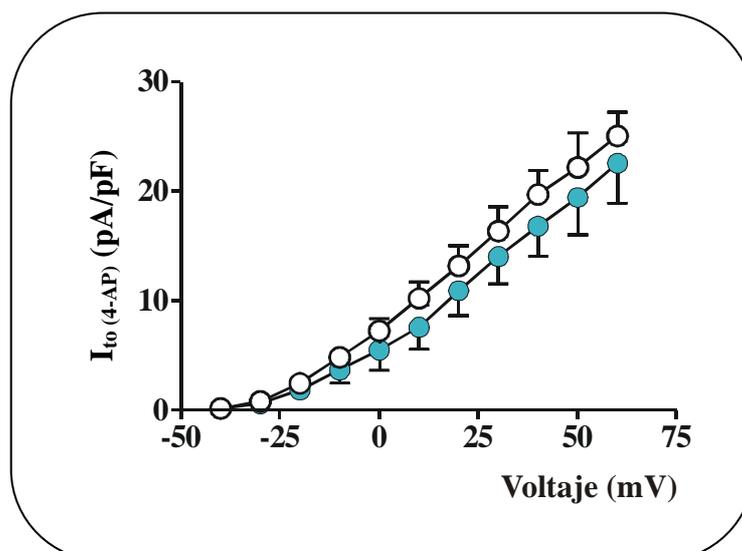


Figura 57. El receptor Y_2 media el efecto del NPY sobre la $I_{to(4-AP)}$. La gráfica muestra la densidad de corriente voltaje de 14 células control (círculos blancos) y de 8 células incubadas con NPY (círculos azules). Los valores se expresaron como la media \pm EEM.

4.2.5.2. IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G EN LA CASCADA DE TRANSDUCCIÓN DEL EFECTO DEL NPY SOBRE $I_{to(4-AP)}$

En general, todos los receptores de NPY han sido descritos como miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G. De hecho, se ha descrito que las acciones mediadas a través de receptores de NPY pueden estar acopladas a distintas familias de proteínas G. La mayoría de los estudios implican, principalmente, a la proteína G_i (Brown y cols., 1995; Michel y cols., 1998), aunque otros estudios también apoyan el acoplamiento del receptor a otras proteínas G (G_q y G_o) (Xiang y Brown, 1993; Brown y cols., 1995).

El bloque de experimentos, que se detalla a continuación, fue diseñado con el fin de precisar si el efecto del NPY sobre la $I_{to(4-AP)}$ estaba mediado por proteínas G sensibles a PTX.

La PTX bloquea lentamente las proteínas G y por ello, fue necesaria la incubación, durante 5 horas, de las células del ápex. Posteriormente, un grupo de células incubadas con PTX se trató con NPY (100 nM), como mínimo 3 horas. El resto de las células se utilizaron como controles.

En la figura 58 se representa la densidad de $I_{to(4-AP)}$ frente al voltaje obtenida en 10 células controles, tratadas con PTX (círculos blancos) y en 13 células incubadas con PTX (al menos 5 horas) antes del tratamiento con NPY (círculos azules).

Los resultados obtenidos para este bloque de experimentos (figura 58) demostraron que en la cascada intracelular que mediaba el efecto, era imprescindible la activación de las proteínas G sensibles a PTX, ya que el aumento de la $I_{to(4-AP)}$ inducido por NPY, desapareció. De hecho, los valores de densidad máximos obtenidos eran muy similares en las células controles y en las células incubadas con NPY ($21,53 \pm 2,77$ y $23,16 \pm 3,78$ para control y NPY, respectivamente).

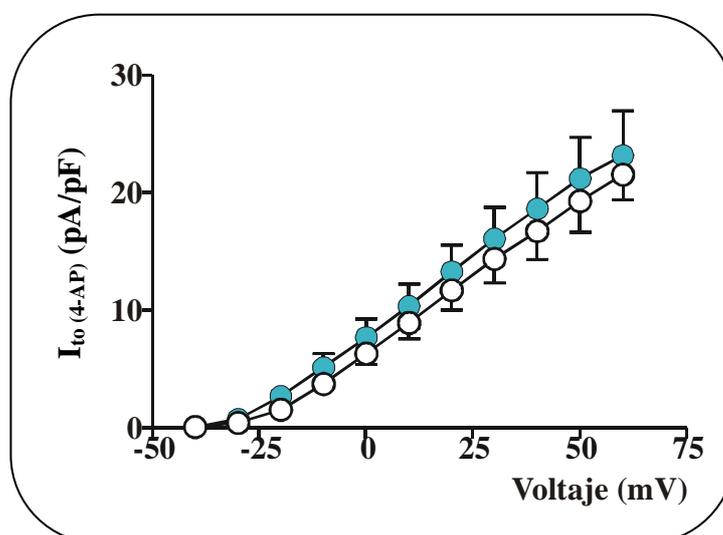


Figura 58. Las proteínas G sensibles a PTX están implicadas en el efecto de NPY sobre $I_{to(4-AP)}$. La gráfica muestra la relación densidad de corriente-voltaje en 10 células controles (círculos blancos) y en 13 células incubadas con NPY (círculos azules). Los valores se expresaron como la media \pm EEM.

4.2.5.3. IMPLICACIÓN DE LA PKC EN EL EFECTO DE NPY SOBRE LA $I_{to(4-AP)}$

Aunque el mecanismo de transducción típicamente descrito para el NPY argumenta la inhibición de la A-C (Michel y cols., 1998), también se ha sugerido la activación de la PLC tras la estimulación de los receptores de NPY (Bell y cols., 1997; Goldberg y cols., 1998). Asimismo, varios estudios han demostrado que la PKC puede modular los canales Kv4 (Nakamura y cols., 1997). Canales, cuyas subunidades clonadas se corresponden con las subunidades nativas del canal de I_{to} cardíaco (Nerbonne, 2000). Por todo ello, era factible que el NPY estimulara la actividad de la

PLC (Bell y cols., 1997) y por tanto, indirectamente, se activara la PKC que podía actuar directamente modulando el canal (Nakamura y cols., 1997).

Así, con el fin de establecer si la PKC podía estar involucrada en el aumento de la $I_{to(4-AP)}$ inducido por NPY, se incubaron las células durante 30 minutos con un bloqueante específico de la PKC, la Calpostina C (Kobayashi y cols., 1989; Bruns y cols., 1991), a la concentración de 100 nM.

Los resultados obtenidos (figura 59) mostraron que el tratamiento de las células con calpostina C anulaba el efecto del NPY sobre la $I_{to(4-AP)}$. Así, las curvas densidad de corriente-voltaje, obtenidas para 13 células tratadas con calpostina C y para 12 células tratadas con calpostina C y con NPY eran muy similares, presentando valores medios máximos de densidad (+60 mV) de $13,96 \pm 1,74$ pA/pF y de $15,56 \pm 2,64$ pA/pF, para las células controles (incubadas con calpostina C) y para las células incubadas con calpostina C y con NPY, respectivamente.

De nuevo, se ponía de manifiesto que la activación de la PKC, era fundamental en la secuencia intracelular que inducía el aumento de la $I_{to(4-AP)}$ mediado por NPY.

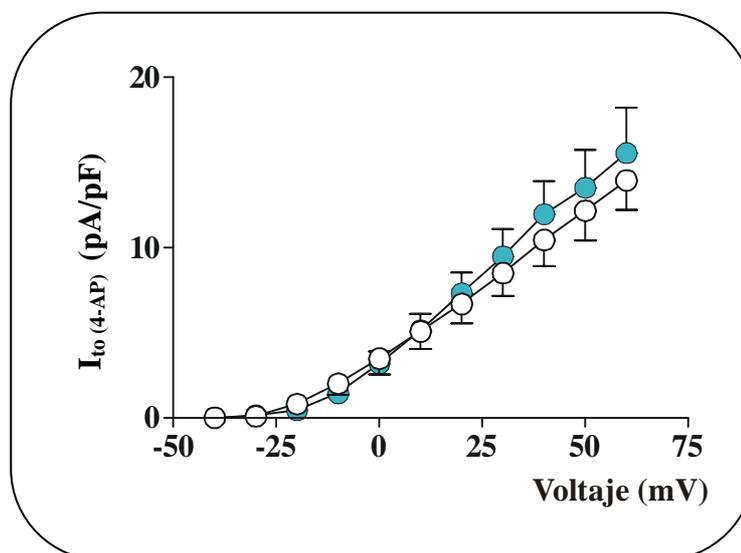


Figura 59. La PKC media el aumento de $I_{to(4-AP)}$ inducido por NPY. La gráfica representa la relación densidad de corriente-voltaje de $I_{to(4-AP)}$ en 13 células controles y 12 células incubadas con NPY. Todas las células se trataron previamente con calpostina C. Los datos se expresan como la media \pm EEM.

Como resumen general de esta sección se podría decir que el aumento de la I_{to} (4-AP), inducido por NPY, se llevaba a cabo a través de la unión del NPY al **receptor Y_2** y que dicha unión activaba una serie de cascadas intracelulares que tenían como mediadores o segundos mensajeros a las **proteínas G sensibles a PTX** y a la **PKC**.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento del NPY, en 1982 (Tatemoto, 1982b), muchos investigadores han estudiado sus efectos en el sistema cardiovascular. Sin embargo, a pesar del elevado número de estudios científicos relacionados con las acciones del péptido en el corazón, no había ningún estudio concluyente sobre la contractilidad, ni tampoco sobre los mecanismos de acción intracelulares. No obstante, la síntesis, en los últimos años, de antagonistas específicos de los receptores del NPY ha facilitado el estudio y comprensión de los complejos y contradictorios efectos del péptido.

De hecho, gracias al acceso a dos antagonistas específicos (cedidos desinteresadamente por Boehringer-Ingelheim) y a la utilización de técnicas tales como la electrofisiología y la fluorescencia, en la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo un estudio detallado de los efectos del NPY en el corazón. La técnica de fluorescencia en microscopía confocal permitió el estudio simultáneo de los movimientos de Ca^{2+} libre citoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y de la contracción celular. Por su parte, la técnica electrofisiológica de *patch-clamp* nos permitió el estudio de la modulación por NPY de las principales corrientes iónicas de membrana.

Gracias al uso de dichas técnicas y herramientas farmacológicas, hemos podido responder a las preguntas planteadas al comienzo de este trabajo de investigación.

Los primeros objetivos se plantearon con el fin de clarificar la controversia existente en cuanto al efecto inotrópico del NPY, en miocitos ventriculares de rata y al mecanismo de transducción implicado en dicho efecto. En este sentido, los resultados mostraron que el NPY inducía un **aumento de la amplitud del transiente** global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la **aceleración de su cinética de relajación**. Dichas variaciones de las características del transiente, podrían explicarse por un **aumento en la carga del retículo sarcoplásmico (RS)**, un **aumento de la amplitud de sus constituyentes elementales (los *sparks* de Ca^{2+})**, o bien por el **incremento de frecuencia** de los mismos. Todo ello, en conjunto, influyó drásticamente en el **aumento de la contracción del miocito**, observado durante la aplicación de NPY.

Por su parte, también se puso de manifiesto, que el efecto del NPY estaba mediado por la modulación de la señalización de Ca^{2+} , a través de su unión al **receptor Y_1** . A su vez, en la cascada intracelular podría verse implicada **la vía de la PKA**, y no así aquellos mecanismos relacionados con las proteínas G sensibles a PTX.

Los siguientes objetivos se plantearon basándose en la importancia de las corrientes iónicas de membrana en el PA y consecuentemente en la contracción. El estudio de la I_{CaL} mostró que esta corriente no estaba implicada en los efectos descritos anteriormente (ni en el aumento del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, ni en el aumento en la contracción). Como contrapartida, la investigación del efecto del NPY sobre la I_{CaL} dio lugar a una interesante investigación que demostró que los estudios de la modulación de la I_{CaL} por fármacos con efectos débiles, deben llevarse a cabo con técnicas que preserven intacto el contenido intracelular (técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado), porque de lo contrario, los efectos podrían infra o sobrestimarse. En el caso concreto que nos ocupa, el NPY **disminuyó la I_{CaL}** y fue más correcto utilizar la configuración de parche perforado ya que por el contrario el efecto del péptido se veía amplificado debido a la diálisis intracelular sufrida por la célula, cuando la configuración utilizada era la de célula entera. Además, el efecto del NPY sobre la I_{CaL} era dependiente de los dos receptores de NPY mayoritarios en el corazón, el Y_1 y el Y_2 .

Los últimos objetivos se plantearon con el fin de demostrar la posible implicación de la I_{to} en el aumento de $[Ca^{2+}]_i$, así como para esclarecer la hipótesis de una dualidad de efectos mediados por dos receptores distintos (M_C Dermott y cols., 1997). Por un lado, los datos demostraron que la I_{to} no mediaba el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ porque no había efecto rápido del péptido sobre la corriente. Por otro lado, se demostró que **el NPY, modulaba efectos contrapuestos a través de sus dos receptores**. Así, en el presente estudio se había demostrado que el receptor Y_1 estaba implicado en los efectos inotrópicos positivos del péptido, y evidenciamos que el NPY, mediante los **receptores Y_2** , inducía un **aumento de la I_{to}** , hecho que implicaba un efecto inotrópico negativo. Además, en la cascada intracelular, que mediaba esta acción, estaban implicados de alguna manera las **proteínas G sensibles a PTX**, y la **PKC**.

Todos los resultados resumidos en los párrafos anteriores serán discutidos en detalle en las siguientes páginas.

Modulación de la contracción por NPY

Si se revisan los antecedentes del tema, es fácil darse cuenta que la polémica, en cuanto al efecto inotrópico del péptido, perdura desde el aislamiento del mismo (Tatemoto, 1982a) hasta nuestros días.

En la presente Tesis Doctoral, se observó que el NPY tenía un efecto inotrópico positivo en miocitos ventriculares de rata (figura 30). Este mismo efecto había sido descrito por otros investigadores (Lundberg y cols., 1984; Franco-Cereceda y cols., 1985; Millar y cols., 1991; Hashim y cols., 1997). Sin embargo, también había autores que postulaban un efecto inotrópico negativo (Awad y cols., 1991; Bryant y cols., 1991; Millar y cols., 1991; Bryant y Hart, 1996) e incluso ausencia de efectos (Allen y cols., 1986; Wahlestedt y cols., 1987; Woo y Ganguly, 1995; Horike y cols., 1997; Serone y Angus, 1999).

Una posible explicación a la diversidad de efectos descritos, podría basarse en las diferentes especies y tejidos utilizados. Así por ejemplo, Millar y cols. (1991) describían efectos contrarios cuando estudiaban la contractilidad en miocitos cardíacos de cobayo o de rata. Otra explicación podría ser debida a la existencia de, al menos, dos subtipos de receptores en el corazón (Y_1 e Y_2) (Michel y cols., 1998). Ambos receptores podrían tener efectos contrapuestos, desencadenando el Y_1 , efectos inotrópicos positivos (figuras 38 y 39), y el Y_2 efectos inotrópicos negativos (figuras 56 y 57) (McDermott y cols., 1997). De hecho, hay un estudio en neuronas de rata donde los dos receptores actúan sobre la I_{CaL} , mostrando efectos de aumento mediados por el receptor Y_1 y efectos de disminución mediados por el receptor Y_2 (Wiley y cols., 1993). Finalmente, otro motivo de discrepancia podría derivar del tiempo al que los efectos son evaluados, ya que el efecto puede ser transitorio (ver más abajo y figura 27).

Modulación de la $[Ca^{2+}]_i$ por NPY

El transiente de $[Ca^{2+}]_i$ es un parámetro fundamental, porque su variación afecta directamente la contracción de los miocitos cardíacos. Su estudio resultó interesante pues daría la pauta de la modulación del acoplamiento E-C por NPY.

Los resultados obtenidos mostraron un **aumento rápido de la amplitud del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$** (figura 28), después de la aplicación de NPY. Este resultado concuerda con la mayoría de los estudios realizados, en otros tejidos, con el

fin de comprobar la acción de NPY sobre este parámetro. Así, datos similares fueron obtenidos, por otros autores, en músculo liso vascular (Mihara y cols., 1989; Jacques y cols., 2000), en células tumorales humanas (Motulsky y Michel, 1988; Aakerlund y cols., 1990), en arterias mesentéricas de rata (Prieto y cols., 2000), en células ventriculares de embriones de pollo (Jacques y cols., 2000) y en miocitos ventriculares de rata (Horike y cols., 1997).

Resulta interesante mencionar que en las condiciones experimentales utilizadas, el aumento del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$, inducido por NPY, era muy rápido (después de 1 minuto de perfusión con NPY) y posteriormente desaparecía con el tiempo (figura 27). En este sentido, otros investigadores también han observado efectos transientes del NPY, en distintas situaciones, tales como el estudio del efecto vasopresor en perros anestesiados (Awad y cols., 1991) o en el aumento del transiente de $[Ca^{2+}]_i$ en el músculo liso vascular (Mihara y cols., 1989) o en células tumorales humanas (Aakerlund y cols., 1990; Grouzmann y cols., 2001).

El efecto transiente del NPY podría deberse a la desensibilización aguda del receptor, fenómeno denominado también taquifilaxia. Este fenómeno se caracteriza por la pérdida de respuesta de una célula a la acción de un ligando, como resultado de la acción de éste sobre la misma. La desensibilización determina que la célula quede protegida frente a la estimulación excesiva o prolongada. En nuestro caso, el NPY podría aumentar la contracción del corazón frente a una situación de estrés de forma aguda o en alguna situación en la que hubiera un fallo adrenérgico. La desensibilización protegería a la célula de los efectos tóxicos de una sobrecarga de Ca^{2+} . Actualmente, algunos estudios han demostrado efectos de taquifilaxia en el receptor Y_1 (Michel, 1994; Gicquiaux y cols., 2002), debido a la internalización de los mismos (Gicquiaux y cols., 2002). Otra posible hipótesis para explicar la desensibilización aguda del receptor Y_1 , se basaría en la presencia de lugares de fosforilación específicos para la PKA en su estructura primaria, al igual que le ocurre a los receptores β_2 -adrenérgicos (Seibold y cols., 2000; Fan y cols., 2001) que también sufren procesos de taquifilaxia. Sin embargo, los receptores Y_4 carecen de estos lugares específicos en su secuencia primaria y no muestran desensibilización aguda (Voisin y cols., 2000).

Por su parte, según los resultados obtenidos, la unión del NPY a su receptor (al Y_1) desencadena un mecanismo de transducción intracelular que induce el aumento de la amplitud del transiente de $[Ca^{2+}]_i$. En principio, este efecto podría estar mediado por

el efecto del NPY sobre cualquiera de los fenómenos básicos ocurridos durante el proceso de acoplamiento E-C y que influyen en la formación del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$: 1) aumento de la I_{CaL} ; 2) aumento de la carga de Ca^{2+} del RS; 3) alteración de la sensibilidad de los RyRs al Ca^{2+} .

Algunos autores señalan a la mayor proporción de Ca^{2+} extracelular que ingresa a la célula, por los canales de Ca^{2+} (I_{CaL}), responsable del aumento del transiente de $[Ca^{2+}]_i$ (Jaques y cols., 2000; Prieto y cols., 2000). No obstante, según los resultados presentados en esta Tesis Doctoral, la I_{CaL} (figuras 46 y 47) no influye en el aumento de la amplitud del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ ya que encontramos una disminución en ella, mediada por NPY (figura 47). Este resultado concuerda con los de otros autores que describen efectos de aumento del transiente, incluso en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Motulsky y Michel, 1988; Mihara y cols., 1989; Aakerlund y cols., 1990; Horike y cols., 1997; Grouzmann y cols., 2001).

Por tanto, nuestros resultados apuntan que la fuente de Ca^{2+} involucrada en los efectos del NPY, sería la reserva interna del RS. Puesto que la I_{CaL} no estaba implicada en la modulación ejercida por el NPY sobre el transiente de $[Ca^{2+}]_i$, debía ser el Ca^{2+} del RS, la diana donde actuaban los segundos mensajeros activados por el péptido. Aunque otros autores (Grouzmann y cols., 2001) habían postulado que la movilización de Ca^{2+} se producía de forma independiente al RS, nuestros resultados mostraron que era en el RS donde se modulaban los efectos del NPY sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$. Este fenómeno se explicaba como consecuencia de la aceleración de la constante de tiempo de relajación (figura 29). Si la constante de tiempo de relajación se hace más rápida, quiere decir que la SERCA también ha incrementado su velocidad de actuación y es capaz de introducir mayores cantidades de Ca^{2+} en el RS (figura 32) y a su vez liberar más por el RyR.

Por el contrario, algunos autores habían descrito que la constante de tiempo de relajación se aceleraba debido al intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Horike y cols., 1997). Sin embargo, no es muy factible que este mecanismo esté implicado porque en la rata, se ha descrito que fase de relajación del transiente de $[Ca^{2+}]_i$ se debe, en su mayoría, a la actividad de la SERCA (responsable de recargar el RS) (92%). El siguiente mecanismo involucrado es el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (7%) que expulsa Ca^{2+} al exterior de la célula (Hove-Madsen y Bers, 1993). Por ello, en el caso que nos ocupa, es más probable que la aceleración en la recogida (figura 29) se deba, principalmente, al incremento de

actividad de la SERCA. Además, los experimentos de cafeína permitieron comprobar la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (figura 32) puesto que en presencia de esta sustancia la actividad de la SERCA se anula (aunque recapte Ca^{2+} , éste es liberado de inmediato por los RyRs bloqueados en el estado abierto). Por tanto, la fase de caída del transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evocado por cafeína depende, casi exclusivamente, de la expulsión de Ca^{2+} al exterior de la célula por medio del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Nuestros resultados muestran que en presencia de cafeína, la fase de relajación del transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no se vio modificado después del tratamiento con NPY (figura 32), descartando, por tanto, la implicación del intercambiador en el efecto del NPY. Por consiguiente, la aceleración del transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figura 29), se debe a la aceleración de la SERCA que será capaz de introducir mayores cantidades de Ca^{2+} en el RS (figura 32 y 33A), como consecuencia de la aplicación de NPY.

Por su parte, la investigación de la modulación de la actividad de los RyRs por el NPY, era el tercero y último de los factores que podía estar involucrado en el aumento del transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducido por NPY. Para el análisis de esta cuestión se estudiaron los *sparks* de Ca^{2+} porque proporcionan una valiosa información sobre la probabilidad de apertura de los RyRs en células intactas (Cannell y cols., 1994).

Los *sparks* de Ca^{2+} (o transientes locales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$) son las unidades elementales que constituyen el transiente global de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ello supone que variaciones en ellos conducirán a variaciones en la magnitud del transiente global. Además, hasta el momento, ningún autor había detallado los efectos del NPY sobre los *sparks* de Ca^{2+} . Ambas cosas hacían que el estudio de los *sparks* de Ca^{2+} , en la presencia de NPY, fuera muy interesante.

La frecuencia de los *sparks* de Ca^{2+} (figura 37) es un índice de la probabilidad de apertura de los RyRs. Además de determinar variaciones en el estado del RyR, como su fosforilación (que puede variar su sensibilidad al Ca^{2+}), la probabilidad de apertura de los RyRs depende del contenido de Ca^{2+} del RS (Cheng y cols., 1996) y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En nuestro caso, puesto que hemos encontrado un aumento de la carga de Ca^{2+} del RS (figura 32 y 33), sugerimos que el aumento de la ocurrencia de *sparks* de Ca^{2+} inducido por NPY (figura 37), es, al menos en parte, secundario al aumento del contenido de Ca^{2+} del RS (figuras 32 y 33). También podría especularse que el NPY modifique de alguna manera el RyR variando su sensibilidad al Ca^{2+} (por ejemplo, a través de la PKA) (figura 50). Sin embargo esta última hipótesis habría que comprobarla con medidas

bioquímicas o con miocitos permeabilizados. Además, nuestros resultados indicaban que el aumento de la frecuencia de los *sparks* de Ca^{2+} , es independiente del flujo de Ca^{2+} extracelular ya que no hemos encontrado un aumento de I_{CaL} después del tratamiento con NPY (figuras 46 y 47) tal y como habían observado previamente, Cheng y cols. (1993).

Por su parte, la amplitud de los *sparks* de Ca^{2+} (figura 34 y 35) se vio incrementada después del tratamiento de las células con NPY. La variación de la amplitud de los *sparks* de Ca^{2+} está relacionada con el aumento en la carga del RS (figura 32 y 33).

A la vista de los datos anteriores, resultaba evidente que el NPY modulaba el acoplamiento E-C mediante la aceleración de la SERCA y la modulación de la actividad de los RyRs. Además según se demostró con el uso de antagonistas específicos (figuras 38 y 39) el receptor implicado en dicha regulación, era el Y_1 , tal y como habían postulado otros investigadores (Aakerlund y cols., 1990; Horike y cols., 1997; Jacques y cols., 2000; Prieto y cols., 2000). Aunque en la literatura también aparecía un estudio que atribuía los efectos del NPY en la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a los receptores Y_2 , en una línea celular procedente de astrocitos humanos (LN319) (Grouzmann y cols., 2001).

Hasta el momento nadie ha descrito los mecanismos de transducción moleculares completos, inducidos por NPY, que median el aumento del transiente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y consecuentemente, de la contracción. Sin embargo, sí se han estudiado los segundos mensajeros que pudieran estar implicados.

Así, los datos aportados en la presente Tesis Doctoral demuestran que las proteínas G sensibles a PTX no están implicadas en la modulación del acoplamiento E-C (figura 40) ni tampoco en la contracción. Los resultados que aparecen en la literatura a este respecto no son unánimes. Algunos estudios afirman que las proteínas G sensibles a PTX median el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por NPY (Motulsky y Michel, 1988; Mihara y cols., 1989; Grouzmann y cols., 2001). Por el contrario, algunos estudios posteriores, enfocados desde un planteamiento experimental distinto, afirmaron que el efecto inotrópico positivo estaba mediado por un mecanismo de transducción independiente de la vía de las proteínas G_i (Millar y cols., 1991; Bell y cols., 1997). Aunque históricamente, el mecanismo de transducción de señal por la vía de las proteínas G_i (Brown y cols., 1995; Michel y cols., 1998) es el más aceptado, es cierto que otros autores han propuesto el acoplamiento del receptor a otras proteínas G (G_q y

G_o) (Xiang y Brown, 1993; Brown y cols., 1995). Incluso algunos de ellos proponían un efecto bifásico de un agonista de NPY, dependiendo de la dosis. Así, a dosis bajas inhibía la enzima A-C por un mecanismo dependiente de proteínas G sensibles a PTX, mientras que a dosis altas estimulaba la enzima A-C mediante la activación de proteínas G sensibles a la toxina del cólera (Sheriff y Balasubramaniam, 1992). Ellos postularon efectos mediados por distintos receptores, tal y como se demuestra en el presente estudio.

Otros péptidos como la angiotensina II y la bradiquinina median sus efectos sobre la señalización de $[Ca^{2+}]_i$ por mecanismos intracelulares implicados en el aumento de IP₃ (Mihara y cols., 1989; Bell y cols., 1997), e independientes de las proteínas G sensibles a PTX (Mihara y cols., 1989).

La hipótesis de que el NPY induzca el aumento de IP₃ (Grouzmann y cols., 2001) como consecuencia del aumento de la actividad enzimática de la PLC_β, inducido por NPY (Bell y cols., 1997), podría ser un mecanismo adecuado para explicar la modulación de $[Ca^{2+}]_i$, en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, algunos autores se muestran contra esta hipótesis (Xiang y Brown, 1993). Pese a todo, este posible mecanismo de transducción de señal no se puede descartar dado que se ha visto que en situaciones patológicas la densidad de los receptores de IP₃ en el RS está aumentada, adquiriendo por ello una importancia en el acoplamiento E-C de la que parece carecer en situaciones fisiológicas en el miocardio (Go y cols., 1995).

Según los resultados obtenidos surgió otra hipótesis. En nuestras condiciones experimentales, la contracción y el transiente de $[Ca^{2+}]_i$ aumentaban (figuras 30 y 28, respectivamente). Curiosamente, cuando se perfundían las células con ISO (figura 41) después del tratamiento con NPY, ninguno de estos parámetros se modificaba. Este resultado, junto con los efectos tan parecidos que encontramos del NPY y del ISO, hizo pensar que ambos podrían compartir parte de la cascada intracelular. Por tanto, era posible que en la cascada estuvieran involucrados la PKA dependiente de AMP_C. De hecho, se ha visto que esta enzima tiene diversos efectos sobre el acoplamiento E-C, entre los que se incluyen la fosforilación del fosfolambano, que resulta en la aceleración de la SERCA (figura 29), el incremento de la carga de Ca²⁺ del RS (figura 32 y 33), y la fosforilación de los RyRs, induciendo un aumento de su probabilidad de apertura (figura 34, 35, 37). Esta hipótesis se ratifica porque después de la aplicación de NPY los efectos típicos del ISO desaparecieron. Es posible que la ausencia de efectos sea debida

a la imposibilidad del ISO de activar la PKA, previamente activada por NPY. Este hecho sugiere que tanto los fármacos β -adrenérgicos, como el NPY comparten una cascada intracelular similar. Hasta el momento, la implicación de la PKA en el efecto cardíaco de NPY, no ha sido descrita por ningún autor en el corazón, aunque sí se ha propuesto un mecanismo bifásico donde dosis altas de un agonista de NPY estimula la enzima A-C por un mecanismo independiente de proteínas G sensibles a PTX (Sheriff y Balasubramaniam, 1992), lo que podría implicar el aumento de AMP_C y la posterior activación de la PKA. Otro estudio realizado en células humanas de neuroblastoma postula que ciertos efectos del NPY están mediados por la vía de la PKA (Soares-Lemos y cols., 1997).

El mecanismo comúnmente descrito para el NPY es la inhibición de la A-C, con la consecuente disminución del AMP_C (Kassis y cols., 1986; Millar y cols., 1988) y el aumento de ATP. Este mecanismo mediaría efectos negativos en la contracción por lo que puede ser lógico pensar que se lleve a cabo por la vía del receptor Y₂, acoplado a proteínas G sensibles a PTX (figura 57 y 58) al que se atribuyen dichos efectos negativos (McDermott y cols., 1997). En cualquier caso, también sería interesante comprobar los efectos de la acumulación de ATP sobre el acoplamiento E-C, de mucha importancia en el músculo esquelético (Lamb, 2000), pero que aparentemente también influye en el corazón (Yang y Steele, 2001; Vassort, 2001).

Efecto del NPY sobre I_{CaL}

La relevancia de la I_{CaL} en el acoplamiento E-C fue discutida en el apartado anterior. Sin embargo, su estudio aportó datos a ese respecto y dio lugar a otro estudio electrofisiológico no menos interesante.

Los experimentos realizados en la configuración de célula entera mostraron que el NPY inducía una disminución de la I_{CaL} (figura 43). En la literatura aparecían pocos trabajos que describieran el efecto del NPY en el corazón. Aún así, los que había eran contradictorios, o bien describían efectos de disminución de la corriente, en miocitos de cobayo (Bryant y Hart, 1996), o bien describían el efecto contrario, en cobayo o en células ventriculares de rata a las que se había bloqueado la I_{to} con 4-AP (Millar y cols., 1991).

La reducción de la I_{CaL} por el NPY ya había sido puesta de manifiesto en otros sistemas celulares. Así, diversos autores describieron una disminución de la I_{CaL} en

células de feocromocitoma (McCullough y cols., 1998), en células HEK 293 (Sun y cols., 1998a) en neuronas del ganglio simpático de sapo (Schofield e Ikeda, 1988), en neuronas ganglionares de rata (Wiley y cols., 1990; Wiley y cols., 1993) y en neuronas simpáticas de rata (Toth y Miller, 1995). Curiosamente, este mismo efecto también se observó en células del nódulo neurointermedio de anfibios utilizando el análogo de NPY para los anfibios, la melanostatina (su secuencia sólo difiere en un aminoácido) (Valentijn y cols., 1994).

Hasta el momento todos los estudios citados habían utilizado la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula entera para el estudio farmacológico de la I_{CaL} . El uso de esta técnica induce dos fenómenos en la I_{CaL} un aumento de la corriente o proceso de *run-up* (Tiaho y cols., 1993) inmediatamente después de la formación del sello y un fenómeno de pérdida de la corriente o fenómeno de *run-down* de la I_{CaL} (Pelzer y cols., 1990; McDonald y cols., 1994). Esto último parece debido a que algunos componentes intracelulares fundamentales para la integridad del canal de Ca^{2+} tipo L se pierden con el tiempo, diluidos por el líquido de la pipeta. Aparentemente, en el corazón, los principales implicados en el proceso de *run-down* son la calpaína (endopeptidasa que regula la degradación y formación de los canales) y la calpastatina (inhibe específicamente a la calpaína). Se ha visto que la diálisis de la primera acelera los procesos de *run-down*, mientras que la diálisis de la calpastatina tiene el efecto contrario (para revisión, McDonald y cols., 1994).

Estos fenómenos suponen un problema en la evaluación de la actividad de un fármaco (en el caso que nos ocupa un péptido) que induzca una moderada inhibición de la I_{CaL} ya que podría sobrestimarse el efecto (figura 45). Por ello, sería importante verificar los resultados de disminución (Bryant y Hart, 1996) o de aumento (Millar y cols., 1991) obtenidos previamente por otros autores con el fin de descartar los efectos de *run-up* o de *run-down*. El único método descrito hasta ahora que preserva el medio intracelular y por tanto, evita posibles modificaciones en la I_{CaL} es la configuración de parche perforado. En esas condiciones se demostró que el NPY inducía una leve disminución de la I_{CaL} (figura 47). Disminución que era menor que la inducida en el caso de los experimentos realizados en la configuración de célula entera (figura 43), donde se añadieron diversos mediadores requeridos para la modulación del canal (ATP, GTP, creatina fosfato, etc.) con el fin de minimizar el *run-down* de la corriente. Este resultado era diferente del obtenido por el grupo de Protas y Robinson, (1999) quienes

utilizando la configuración de parche perforado, afirmaron que tras la exposición aguda de NPY no se modificaba la I_{CaL} . Sin embargo, es factible que las diferencias observadas se deban al uso de miocitos en diferente estado de diferenciación (miocitos neonatales en su caso y miocitos adultos en el caso que no ocupa).

Con respecto al receptor que media la disminución de la corriente, inducida por NPY, no parece que exista especificidad y se requieren ambos para dicha modulación (figura 48). Este hecho también ha sido descrito en neuronas centrales y periféricas (McQuiston y cols., 1996; Chen y Van den Pol, 1996) aunque Wiley y cols. (1993), propusieron efectos opuestos sobre la I_{CaL} en función del receptor de NPY que se activara (Wiley y cols., 1993).

Con los datos presentados es difícil explicar la relevancia fisiológica que pueda tener la disminución de I_{CaL} en el corazón. Sería interesante registrar las variaciones ocasionadas en el PA, al igual que han realizado otros autores (Bryant y Hart, 1996) para demostrar si realmente esa pequeña variación en la I_{CaL} es capaz de acortar el PA, puesto que la corriente I_{to} se mantiene en la perfusión aguda con el NPY (figura 51). Sin embargo, según los datos presentados en la presente Tesis Doctoral no parece que sea relevante, dado que el efecto final sobre la contracción es inotrópico positivo (figura 30).

Por otro lado, tampoco parece que el NPY module la I_{CaL} , una vez que esta ha sido activada con el ISO (figura 50). En este sentido, otros autores han descrito que el péptido es capaz de disminuir las concentraciones de AMP_C , previamente estimuladas por ISO, o por forskolina (Kassis y cols., 1987; Millar y cols., 1988). Los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral no son concluyentes en este sentido. En cualquier caso, aunque no se haya evidenciado un efecto claro de disminución de la I_{CaL} , después del tratamiento con ISO, no se puede obviar que la modulación de la misma se lleva a cabo por los dos receptores de NPY para los que se han descrito efectos opuestos (McDermott y cols., 1997). Por consiguiente, sería factible que uno de los receptores estuviera mediando los efectos de disminución del AMP_C , y el otro tuviera el efecto contrario, anulándose los efectos de uno de los receptores con los del otro.

Efecto de NPY sobre I_{to}

Tal y como se ha explicado anteriormente, nuestros resultados mostraron que el NPY mediaba su efecto sobre la señalización de $[Ca^{2+}]_i$ a través del receptor Y_1 . Esto,

junto con el hecho de que otros autores ya habían postulado efectos duales (M_CDermott y cols., 1997), hicieron que el estudio de NPY sobre la I_{to} resultara muy interesante. La acción del péptido sobre dicha corriente podría estar mediada por el otro receptor, el Y₂. Este hallazgo podría ser la explicación de los efectos contradictorios descritos por diferentes autores. También podría explicar la ausencia de efectos del NPY descritos por otros investigadores, debido a la activación simultánea de los dos subtipos de receptores con efectos contrapuestos.

Por tanto, este bloque de experimentos fue diseñado para estudiar el efecto de NPY sobre la I_{to} y más específicamente, sobre la I_{to (4-AP)} (corriente implicada en la fase temprana de repolarización del PA). Los resultados demostraron que el NPY induce un aumento de la densidad de I_{to} y que esta modulación se media a través del subtipo de receptor Y₂. Además en la cascada intracelular que medió el efecto estaban involucradas las proteína G_i y la PKC.

En los miocitos ventriculares de rata además de la I_{to}, se han descrito otras corrientes de potasio, la I_K y la I_{K1} (Barry y Nerbonne, 1996). Sin embargo, la I_{to} se ha descrito como la corriente principalmente implicada en la fase de repolarización temprana de varios tejidos, incluyendo la rata (Apkon y Nerbonne, 1991), el conejo (Hiraoka y Kawano, 1989), el perro (Tseng y Hoffman, 1989) y el hombre (Wettwer y cols., 1994) pero no el cobayo (Hume y Uehara, 1985). Más concretamente, se ha demostrado que la corriente implicada en este proceso es la corriente transitoria de potasio sensible a 4-AP (I_{to (4-AP)}) (Hiraoka y Kawano, 1989; Tseng y Hoffman, 1989, Gómez y cols., 1997), corriente objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral demostraron que la exposición al NPY (100 nM) aumentó la densidad de I_{to (4-AP)} en células ventriculares de rata (figura 54). Estos resultados corroboraron los estudios previos de otro grupo de investigación (Millar y cols., 1991), quienes también observaron un incremento de la corriente en el mismo modelo animal. Sin embargo, el efecto de NPY sobre I_{to} no resultaba exclusivo del tejido objeto de estudio, ya que otros tejidos como el núcleo arcuate del cerebro de la rata (Rhim y cols., 1997) y las neuronas simpáticas de sapo (Zidichouski y cols., 1990) también sufrían modificaciones al alza cuando se trataban con el NPY.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios afirmaban la implicación de las proteínas G_i en los efectos mediados por NPY (Michel y cols., 1998). Nuestros

resultados corroboraron esta afirmación. De hecho, la ADP ribosilación de la subunidad α de la proteína G con PTX, hizo desaparecer el efecto de NPY sobre la I_{to} , indicando que las proteínas G sensibles a PTX estaban involucradas en el proceso (figura 58).

Por tanto, la implicación de las proteínas G sensible a PTX, en el efecto observado encuentran, en parte, su explicación en el ya mencionado hecho de su acoplamiento con los receptores específicos de NPY (Michel y cols, 1998). No obstante, no hay que olvidar que las proteínas G también pueden regular los canales de potasio por la unión directa de la subunidad α (Leaney y Tinker, 2000) o de la subunidad $\beta\gamma$ (Wickman y cols., 1994) a lugares específicos del canal. Asimismo, también se había afirmado una regulación indirecta mediante la producción de segundos mensajeros por activación de ciertas enzimas acopladas a las proteínas G, tales como la A-C (Babenko y Vassort, 1997) y la PLC (Lee y cols., 2001). A pesar de todo, parece probable que el efecto de las proteínas G sobre el canal de potasio objeto de estudio (I_{to}) sea indirecto, puesto que hasta el momento no existe ninguna evidencia de una regulación directa del canal por las proteínas G (Oudit y cols., 2001).

Por su parte, las reacciones de fosforilación y desfosforilación pueden ser factores clave implicados en la modulación de los canales iónicos de membrana (Murray y cols., 1994; Murakoshi y cols., 1997; Zhu y cols., 1999). Parece aceptado que la activación de la PKC modula directamente los canales de potasio, y más concretamente el canal de I_{to} . De hecho, algunos experimentos realizados en los canales Kv4, cuyos genes expresan subunidades primarias del canal nativo de I_{to} , en el corazón (Nerbonne, 2000), mostraban la reducción de la I_{to} , después de la activación de la PKC con un éster de forbol (Nakamura y cols., 1997). Resultado que corroboraba el efecto encontrado anteriormente, en miocitos ventriculares de rata (Apkon y Nerbonne, 1991). Igualmente, se ha demostrado que en otros tejidos y especies, la PKC también es responsable de la disminución de la corriente de K^+ (Zhu y cols., 1999; Kamimura y cols., 2000).

No obstante, otros autores también han postulado que la activación de la PKC está implicada en el aumento de la I_{to} inducido por NA, en epicardio de perros con enfermedad de Chagas (Han y cols., 1997) y en aurícula de conejo (Braun y cols., 1990). De igual forma, se la ha implicado en el aumento de otros canales de potasio presentes en células cardíacas de cobayo (Tohse y cols., 1987).

Los estudios llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral corroboran los estudios que afirman una modulación al alza de la I_{to} tras el tratamiento con NPY (100 nM). Efecto que demostró estar mediado por la PKC, ya que desapareció después del tratamiento de los miocitos apicales de rata con un inhibidor de la PKC (la calpostina C) (figura 59).

La variedad de isoformas de PKC ($PKC\alpha$, $PKC\delta$, $PKC\epsilon$) existentes en el corazón (Disatnik y cols., 1997), podría explicar la disparidad de resultados obtenidos como consecuencia de la activación de la PKC. Dado que cada isoforma parece tener una función biológica distinta en el miocardio (Mende y cols., 1999; Naruse y King, 2000), podría ocurrir que cada una tuviera efectos distintos sobre el canal de potasio. Así, un estudio reciente ha demostrado que la reducción de la I_{to} está mediada, principalmente, por la translocación y unión de la isoforma $PKC\epsilon$ a sus proteínas de anclaje, denominadas RACKS (del inglés *receptors for activated C-kinases*) (Shimoni, 1999).

Otra hipótesis apunta que los efectos opuestos encontrados en la I_{to} , después de la activación de la PKC pueden deberse a la existencia, en el canal, de dos lugares de fosforilación distintos. Uno de ellos relacionado con el aumento de la corriente y otro involucrado en la disminución de la misma. De este modo explican algunos autores la dualidad de efectos encontrados en canales *Aplysia Kv1* (Furukawa y cols., 1995) y en los canales *minK-KvLQT1* (Lo y Numann, 1998).

La activación de las proteínas G sensibles a PTX y de las PKC depende de la unión del NPY a sus receptores específicos. Aunque se han descrito seis subtipos (y únicamente cinco han sido clonados), tan sólo tres de ellos se han descrito en el corazón (McDermott y cols., 1997).

En nuestras condiciones experimentales resultó interesante caracterizar el subtipo implicado en la regulación de la I_{to} , para ahondar en el mecanismo de transducción de señal que indujo el efecto, e investigar si los efectos duales descritos para el NPY se podían explicar como consecuencia de los efectos contrapuestos de los dos receptores más importantes presentes en el tejido objeto de estudio. La investigación llevada a cabo (descrita en la sección 4.2.5.1 de resultados, figuras 56 y 57) con antagonistas específicos de los receptores Y_1 e Y_2 , demostró que el subtipo Y_2 era el receptor implicado en el aumento de la I_{to} (4-AP). Si bien la función en el corazón

de estos receptores no se conoce con exactitud, se ha propuesto que los receptores Y_1 podrían mediar los efectos inotrópicos positivos, mientras que los receptores Y_2 estarían implicados en los efectos inotrópicos negativos (M_CDermott y cols., 1997). En este sentido, los resultados del presente Trabajo de Investigación están de acuerdo con esta hipótesis. Es decir, el aumento de la $I_{to(4-AP)}$ inducido por NPY a través de los receptores Y_2 produciría un acortamiento del PA. Hecho que reduciría el tiempo disponible para la entrada de Ca^{2+} y por tanto, reduciría la contracción.

Así, con los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral sólo se puede afirmar que el NPY modula la densidad de I_{to} por un mecanismo intracelular que incluye al receptor Y_2 , las proteínas G sensibles a PTX y la PKC. Sin embargo, se podría especular que el subtipo Y_2 esté acoplado a proteínas G sensibles a PTX, que a su vez activen la cascada de la PLC. Mecanismo que ha sido recientemente descrito para explicar la estimulación del canal K_{ATP} implicado en el papel cardioprotector de la adenosina (Lee y cols., 2001). La PLC genera el DAG como segundo mensajero que a su vez activará la PKC. Por último, la PKC modularía el canal, posiblemente mediante la fosforilación del mismo (Murray y cols., 1994; Furukawa y cols., 1995).

Efectos duales del NPY

A lo largo del desarrollo de esta discusión se ha mencionado en varias ocasiones la posibilidad de que el NPY tuviera efectos opuestos en función de los receptores sobre los que actuara. Esta hipótesis ha sido defendida por algunos autores que han estudiado los efectos del NPY en el corazón (M_CDermott y cols., 1997), pero también por otros que lo han hecho en el SNC (Wiley y cols., 1993). Así, en la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que el receptor el Y_1 es capaz de inducir un aumento, tanto en el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ (figura 31) como en la contracción (figura 30). Por el contrario, se ha mostrado que el receptor Y_2 media los efectos de aumento de la I_{to} (figura 54). Este hallazgo también parece consecuente con la hipótesis postulada por otros autores. Ellos apuntaron que los efectos positivos se debían al Ca^{2+} , mientras que los negativos eran debidos al aumento de la corriente de potasio (Millar y cols., 1991). Sin embargo, todavía quedan por esclarecer los factores que influyen en el predominio de uno u otro receptor (si ambos están presentes) y por tanto, está pendiente descubrir cuando y porqué se desencadena un efecto y no otro.

Si ambos receptores están presentes, lo lógico sería que, ante efectos contrapuestos, no hubiera respuesta al NPY. Sin embargo el efecto obtenido (en nuestras condiciones experimentales), en miocitos intactos, es inotrópico positivo. La explicación podría ser que no se encuentren en la misma proporción. Así, podría suceder que en situaciones fisiológicas predomine el efecto del receptor Y_1 , pero es posible que en situaciones patológicas, como la hipertrofia cardíaca, el receptor Y_2 se encuentre en mayor proporción, pues ha sido a él a quién se han atribuido los efectos crónicos del péptido. Así por ejemplo, algunos estudios señalaban al receptor Y_2 como el responsable de la modulación inducida por NPY, de distintas corrientes durante el desarrollo (Protas y Robinson, 1999; Qu y cols., 2000). Otros autores le implicaban en el efecto angiogénico del NPY (Zukowska-Grodjec y cols., 1998), mientras que otros estudios atribuían los efectos tróficos del péptido a dicho receptor (Millar y cols., 1994). Se demostró que el NPY podía retardar la degradación de las proteínas y a más largo plazo, incluso inducir su síntesis (Millar y cols., 1994).

No obstante, en situaciones fisiológicas, también cabe la posibilidad de que los efectos del NPY sobre los diferentes subtipos de receptores dependan del tiempo. Tal y como se ha demostrado en el presente estudio, el efecto de NPY sobre el receptor Y_1 es agudo (figura 27), mientras que el efecto del NPY sobre el Y_2 se desencadena más lentamente (figuras 51 y 53). Además, este hecho estaría en concordancia con aquellos estudios que apuntan que los efectos del receptor Y_2 ocurren a más largo plazo (Millar y cols., 1994; Zukowska-Grodjec y cols., 1998; Protas y Robinson, 1999; Qu y cols., 2000) y con aquellos que apuntan efectos notables pero transientes del receptor Y_1 debido a la taquifilaxia del mismo (Michel y cols., 1994; Gicquiaux y cols., 2002).

En definitiva, a lo largo del desarrollo de este trabajo se han resuelto las preguntas planteadas en el inicio. Así, se puede afirmar que el NPY tiene efectos duales mediados por dos receptores, el Y_1 y el Y_2 , que al parecer actúan a distintos tiempos y desencadenan mecanismos de señalización intracelular diferente. Así, se podría sugerir que el receptor Y_1 actúa a través de la PKA sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular, mientras que el Y_2 tiene efectos sobre la I_{to} por un mecanismo que incluye la vía de la

PKC. Aún así, son necesarias más investigaciones al respecto, con el fin de explicar, por ejemplo, la importancia fisiológica de los efectos duales del péptido y para demostrar si la distribución de los receptores en las diferentes zonas del corazón es homogénea. Por otro lado, también resultaría sumamente interesante estudiar la respuesta del NPY en situaciones patológicas (hipertrofia cardíaca o insuficiencia cardíaca) y la variación en la densidad y distribución de sus receptores en dichas situaciones.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El NPY induce un aumento del transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ mediante el aumento de la amplitud y la frecuencia de los sparks, así como por el aumento de la carga de Ca^{2+} del RS. Todo ello resulta en el aumento de la contracción de los miocitos ventriculares de rata.
2. El efecto del NPY sobre el transiente global de $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción está mediado por el receptor Y_1 y por mecanismos dependientes de la PKA.
3. El estudio del efecto de NPY sobre la I_{CaL} es más adecuado realizarlo en la configuración de parche perforado, para evitar los mecanismos de diálisis intracelular que ocasionan el *run-down* de la I_{CaL} .
4. El NPY disminuye la I_{CaL} por un mecanismo que incluye la interacción del péptido con el receptor Y_1 y con el receptor Y_2 .
5. La I_{to} disminuye como consecuencia de la perfusión de los miocitos ventriculares de rata con NPY. Este efecto está mediado por proteínas G sensibles a PTX y por la PKC.
6. En nuestras condiciones experimentales, los receptores Y_1 e Y_2 desencadenan efectos contrarios. El Y_1 se relaciona con los efectos de aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la contracción. Sin embargo, el receptor Y_2 media los efectos negativos ya que induce un aumento de la I_{to} favoreciendo el acortamiento del PA.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- * **Aakerlund L, Gether U, Fuhlendorff J, Schwartz TW, Thastrup O.** “Y₁ receptors for neuropeptide Y are coupled to mobilization of intracellular calcium and inhibition of adenylate cyclase”. *FEBS Letters*. 1990; **260** (1): 73-78.
- * **Abrahamsson C.** “Neuropeptide Y₁- and Y₂-receptor-mediated cardiovascular effects in the anesthetized guinea pig, rat and rabbit”. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2000; **36** (4): 451-458.
- * **Ackerman MJ, Claphan DE.** “Cardiac chloride channels”. *Trends Cardiovasc. Med.* 1993; **3**: 23-28.
- * **Adachi-Akahane S, Cleemann, L, Morad M.** “Cross-signaling between L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes”. *J. Gen. Physiol.* 1996; **108**: 435-454.
- * **Ahmed GU, Dong PH, Song G, Ball NA, Xu Y, Walsh RA, Chiamvimonvat N.** “Changes in Ca²⁺ cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure”. *Circ. Res.* 2000; **86** (5): 558-570.
- * **Allen JM, Bircham PM, Edwards AV, Tatemoto K, Bloom SR.** “Neuropeptide Y reduces myocardial perfusion and inhibits the force of contraction of the isolated perfused rabbit heart”. *Regul. Pept.* 1983; **6** (3): 247-253.
- * **Allen JM, Gjørstrup P, Björkman J-A, Abrahamsson LET, Bloom SR.** “Studies on cardiac distribution and function of neuropeptide Y”. *Acta Physiol Scand.* 1986; **126**: 405-411.
- * **Andrews PC, Hawke D, Shively JE, Dixon JE.** “A non-amidated peptide homologous to porcine peptide YY and neuropeptide YY”. *Endocrinology.* 1985; **116**: 2677-2681.
- * **Antonijevic IA, Murck H, Bohlhalter S, Frieboes R-M, Holsboer F, Steiger A.** “Neuropeptide Y promotes sleep and inhibits ACTH and cortisol release in young men”. *Neuropharmacol.* 2000; **39**: 1474-1481.
- * **Antzelevitch C, Fish J.** “Electrical heterogeneity within the ventricular wall”. *Basic Res. Cardiol.* 2001; **96**: 517-527.
- * **Anversa P, Annarosa L, Kajstura J, Nadal-Ginard B.** “Myocyte growth and cardiac repair”. *J. Mol. Cardiol.* 2002; **34**: 91-105.
- * **Anversa P, Kajstura J.** “Ventricular myocytes are not terminally differentiated cells in the adult mammalian heart”. *Circ. Res.* 1998; **83**: 1-14.
- * **Aoki C, Pickel VM.** “Neuropeptide Y in cortex and striatum: Ultrastructural distribution and coexistence with classical neurotransmitters and neuropeptides”. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1990; **611**: 186-205.
- * **Apkon M, Nerbonne JN.** “Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes”. *J. Gen. Physiol.* 1991; **97**: 973-1011.
- * **Armstrong CM, Hille B.** “Voltage-gated ion channels and electrical excitability”. *Neuron.* 1998; **20**: 371-380.

-
- * **Awad SJ, Eisntein R, Potter EK, Richardson DP.** “The effects of neuropeptide Y on myocardial contractility and coronary blood flow”. *Br. J. Pharmacol.* 1991; **104**: 195-201.
 - * **Babenko A, Vassort G.** “Purinergic facilitation of ATP-sensitive potassium current in rat ventricular myocytes”. *Br. J. Pharmacol.* 1997; **120**: 631-638.
 - * **Balasubramaniam A, Grupp I, Matlib MA, Benza R, Jackson RL, Fischer JE, Grupp G.** “Comparison of the effects of neuropeptide Y (NPY) and 4-norleucine-NPY on isolated perfused rat hearts: effects of NPY on atrial and ventricular strips of rat heart and on rabbit heart mitochondria”. *Regul. Peptides.* 1988; **21**: 289-299.
 - * **Balasubramaniam A, Sheriff S, Johnson ME, Prabhakaran M, Huang Y, Fischer JE, Chance WT.** “[D-TRP32]NPY: a competitive antagonist of NPY in rat hypothalamus”. *J. Med. Chem.* 1994; **37**: 811-815.
 - * **Balasubramaniam A, Sheriff S, Rigel DF, Fischer JE.** “Characterization of neuropeptide Y binding sites in rat cardiac ventricular membranes”. *Peptides.* 1990; **11**: 545-550.
 - * **Barrere-Lemaire S, Piot c, Leclercq F, Nargeot J, Richard S.** “Facilitation of L-type calcium currents by diastolic depolarization in cardiac cells: impairment in heart failure”. *Cardiovasc. Res.* 2000; **47**: 336-349.
 - * **Barry DM, Nerbonne JM.** “Myocardial potassium channels: Electrophysiological and molecular diversity”. *Annu. Rev. Physiol.* 1996; **58**: 363-394.
 - * **Bassani JWM, Bassani RA, Bers DM.** “Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms”. *J. Physiol.* 1994; **476**: 279-293.
 - * **Bassani RA, Bers DM.** “Na⁺-Ca²⁺ exchange is required for rest-decay but not for rest-potential of twitches in rabbit and rat ventricular myocytes”. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994; **26**: 1335-1347.
 - * **Beal MF, Mazurek MF, Chattha GK, Svendsen CN, Bird ED, Martin JB.** “Neuropeptide Y immunoreactivity is reduced in cerebral cortex in Alzheimers’s disease”. *Ann. Neurol.* 1986; **20**: 282-288.
 - * **Beaulieu P, Lambert C.** “Peptidic regulation of heart rate and interactions with the autonomic nervous system”. *Cardiovasc. Res.* 1998; **37**: 578-585.
 - * **Bell D, Millar BC, McDermott BJ.** “Use of D-myo inositol 1,2,6 trisphosphate to inhibit contractile activity in rat ventricular cardiomyocytes induced by neuropeptide Y and other cardioactive peptides through phospholipase C”. *Br. J. Pharmacol.* 1997; **122**: 1655-1660.
 - * **Belles B, Malécot CO, Hescheler J, Trautwein W.** “Run-down of the Ca²⁺ current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intracellular calcium”. *Pflügers Arch.* 1988; **411**: 353-360.
 - * **Bénitah JP, Bailly P, D’agrosa MC, Ponte JP, Delgado C, Lorente P.** “Slow inward current in single cells isolated from adult human ventricles”. *Pflügers Arch.* 1992; **421**: 176-187.
 - * **Bénitah JP, Gómez AM, Bailly P, Ponte DA, Berson G, Delgado C, Lorente P.** “Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts”. *J. Physiol.* 1993; **469**: 111-138.
 - * **Bénitah JP, Perrier E, Gómez AM, Vassort G.** “Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes”. *J. Physiol.* 2001; **537** (1): 151-160.
-

-
- * **Bénitah JP, Vassort G.** “Aldosterone upregulates Ca^{2+} current in adult rat cardiomyocytes”. *Cir. Res.* 1999; **85**: 1139-1145.
 - * **Berglund MM, Lundell I, Eriksson H, Söll R, Beck-Sickinger AG, Larhammar D.** “Studies of the human, rat, and guinea pig Y_4 receptors using neuropeptide Y analogues and two distinct radioligands”. *Peptides.* 2001; **22**: 351-356.
 - * **Bers DM, Pérez-Reyes E.** “ Ca^{2+} channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release”. *Cardiovasc. Res.* 1999; **42**: 339-360.
 - * **Bers DM.** “Cardiac excitation-contraction coupling”. *Nature.* 2002; **415**: 198-205.
 - * **Bers DM.** “Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force”. Kluwer Academic Publishers. 1991.
 - * **Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich B.** “Bell-shaped calcium response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum”. *Nature.* 1991; **351**: 751-754.
 - * **Bischoff A, Erdbrügger W, Smits J, Michel MC.** “Dissociation of renal vasoconstrictory and diuretic effects of neuropeptide Y (NPY)”. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1994; **349** (suppl):R49.
 - * **Bischoff A, Gerbracht A, Michel MC.** “Gender and hypertension interact to regulate neuropeptide Y receptor responsiveness”. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; **361**: 173-180.
 - * **Blomqvist AG, Roubos EW, Larhammar D, Martens GJM.** “Cloning and sequence analysis of a neuropeptide Y/peptide Y receptor Y_1 cDNA from *Xenopus laevis*”. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995; **1261**: 439-441.
 - * **Böhm M, Gräbel C, Knorr A, Erdmann E.** “Treatment in hypertensive cardiac hypertrophy, Neuropeptide Y and β -adrenoceptors”. *Hypertension.* 1995; **25** (5): 954-961.
 - * **Bouchard RA, Clark RB, Giles WR.** “Effects of action potential duration on excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes”. *Circ. Res.* 1995; **76**: 790-801.
 - * **Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M.** “Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats”. *Neuroendocrinol.* 1990; **52**: 441-447.
 - * **Braun AP, Fedida D, Clark RB, Giles WR.** “Intracellular mechanisms for α_1 -adrenergic regulation of the transient outward current in rabbit atrial myocytes”. *J. Physiol.* 1990; **431**: 689-712.
 - * **Britton KT, Southerland S, Van Uden E, Kirby D, Rivier JE, Koob G.** “Anxiolytic activity of NPY receptor agonists in the conflict test”. *Psychopharmacol.* 1997; **132**: 6-13.
 - * **Britton KT, Southerland S.** “Naloxone blocks “anxiolytic” effects of neuropeptide Y”. *Peptides.* 2001; **22**: 607-612.
 - * **Brittsan AG, Kranias EG.** “Phospholamban and cardiac contractile function”. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; **32**: 2131-2139.
 - * **Brown NA, McAllister G, Weinberg D, Milligan G, Seabrook GR.** “Involvement of G-protein α_1 subunits in activation of G-protein gated inward rectifying K^+ channels (GIRK1) by human NPY_1 receptors”. *Br. J. Pharmacol.* 1995; **116**: 2346-2348.
-

-
- * **Bruns RF, Miller FD, Merriman RL, Howbert JJ, Heath WF, Kobayashi E, Takahashi I, Tamaoki T, Nakano H.** “Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; **176** (1): 288-293.
 - * **Bryant SM, Hart G.** “Effects of neuropeptide Y on L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes”. *Br. J. Pharmacol.* 1996; **118**: 1455-1460.
 - * **Bryant SM, Ryder KO, Hart G.** “Effects of neuropeptide Y on cell length and membrane currents in isolated guinea pig ventricular myocytes”. *Circ. Res.* 1991; **69**: 1106-1113.
 - * **Burkhoff A, Linemeyer DL, Salon JA.** “Distribution of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor gene and its absence in rat”. *Brain Res Mol. Brain Res.* 1998; **53**: 311-316.
 - * **Cabrele C, Langer M, Bader R, Wieland HA, Doods HN, Zerbe O, Beck-Sickinger AG.** “The first selective agonist at the neuropeptide Y Y₅ receptor increases food intake in rats”. *J. Biol. Chem.* 2000; **275** (46): 36043-36048.
 - * **Callewaert G.** “Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells”. *Cardiovasc. Res.* 1992; **26**: 923-932.
 - * **Campfield LA, Smith FJ, Burn P.** “The OB protein (leptin) pathway-a link between adipose tissue mass and central neural networks”. *Horm. Metab. Res.* 1996; **28**: 619-632.
 - * **Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ.** “Spatial non-uniformities in [Ca²⁺]_i during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes”. *Biophys. J.* 1994; **67**: 1942-1956.
 - * **Carafoli E.** “Calcium signaling: A tale for all seasons”. *PNAS.* 2002; **99** (3):1115-1122.
 - * **Carmeliet E.** “Potassium channels in cardiac cells: mechanisms of activation, inactivation and K⁺ sensitivity”. *Pflügers Arch.* 1989; **414** (supl 1): S88-S92.
 - * **Catterall WA.** “Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels”. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 2000; **16**: 521-555.
 - * **Chan YY, Steiner RA, Clifton DK.** “Regulation of hypothalamic neuropeptide Y neurons by growth hormone in the rat”. *Endocrinology.* 1996; **137**: 1319-1325.
 - * **Chen G, Van den Pol AN.** “Multiple NPY receptors coexist in pre and postsynaptic sites: inhibition of GABA release in isolated self innervating SCN neurons”. *J. Neurosci.* 1996; **16**: 7711-7724.
 - * **Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB.** “Calcium sparks and [Ca²⁺]_i waves in cardiac myocytes”. *Am. J. Physiol.* 1996; **270**: C148-C159.
 - * **Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB.** “Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle”. *Science.* 1993; **262**: 740-744.
 - * **Cheung WY.** “Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation”. *Science.* 1980; **207**: 19-27.
 - * **Chevendra V, Weaver LC.** “Distribution of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide and somatostatin in populations of postganglionic neurons innervating the rat kidney, spleen and intestine”. *Neuroscience.* 1992; **50**: 727-743.
 - * **Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP.** “Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats”. *Endocrinology.* 1984; **115**: 427-429.

-
- * **Clark JT, Keaton AK, Sahu A, Kalra SP, Mahajan SC, Gudger JN.** “Neuropeptide Y (NPY) levels in alcoholic and food restricted male rats: Implications for site selective function”. *Regul. Pept.* 1998; **75** (6): 335-345.
 - * **Cleary J, Semotuk M, Levine AS.** “Effects of neuropeptide Y on short-term memory”. *Brain Res.* 1994; **653**: 210-214.
 - * **Colmers WF, Bleakman D.** “Effects of neuropeptide Y on the electrical properties of neurons”. *Trends Neurosci.* 1994; **17**: 373-379.
 - * **Coraboeuf E, Carmeliet E.** “Existence of two transient outwards currents in sheep cardiac purkinje fibers”. *Pfügers Arch.* 1982; **392**: 352-359.
 - * **Croll SD, Chesnutt CR, Greene NA, Lindsay RM, Wiegand SJ.** “Peptide immunoreactivity in aged rat cortex and hippocampus as a function of memory and BDNF infusion”. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999; **64** (3): 625-635.
 - * **Cruz JD.** “Whether “slip-mode conductance” occurs”. *Science.* 1999; **284**: 711a.
 - * **Daniels AJ, Chance WT, Grizzle MK, Heyer D, Matthews JE.** “Food intake inhibition and reduction in body weight gain in rats treated with GI264879A, a non-selective NPY-Y₁ receptor antagonist”. *Peptides.* 2001; **22**: 483-491.
 - * **Delgado C, Artiles A, Gómez AM, Vassort G.** “Frequency-dependent increase in cardiac Ca²⁺ current is due to reduced Ca²⁺ release by the sarcoplasmic reticulum”. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1999; **31**: 1783-1793.
 - * **Dibona GF, Sawin LL.** “Role of neuropeptide Y in renal sympathetic vasoconstriction: studies in normal and congestive heart failure rats”. *J. Lab. Clin. Med.* 2001; **138** (2): 119-129.
 - * **Difrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C.** “Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node”. *J. Physiol.* 1986; **377**: 61-88.
 - * **Disatnik M-H, Buraggi G, Mochly-Rosen D.** “Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes”. *Exp. Cell. Res.* 1997; **210**: 287-297.
 - * **Doods HN, Gaida W, Wieland HA, Dollinger H, Schnorrenberg G, Esser F, Engel W, Eberlein W, Rudolf K.** “BIIE0246: a selective and high affinity neuropeptide Y Y₂ receptor antagonist”. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; **384**: R3-R5.
 - * **Doods HN, Wieland HA, Engel W, Eberlein W, William KD, Entzeroth M, Wiene W, Rudolf K.** “BIBP3226, the first selective neuropeptide Y₁ receptor antagonist: a review of its pharmacological properties”. *Regul. Pept.* 1996; **65**: 71-77.
 - * **Downes y Gautam.** “The G protein subunit gene families”. *Genomics.* 1999; **62**: 544-552.
 - * **Duckles SP, Buxton ILO.** “Neuropeptide Y potentiates norepinephrine-stimulated inositol phosphate production in the rat tail artery”. *Life Sciences.* 1994; **55** (2): 103-109.
 - * **Duggan AW, Hope PJ, Lang CW.** “Microinjection of neuropeptide Y into the superficial dorsal horn reduces stimulus-evoked release of immunoreactive substance P in the anaesthetized cat” *Neuroscience.* 1991; **44**: 733-740.
 - * **Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Pheng, LH, Abounader R, Hamel E, Jacques D, Regoli D, Quirion R.** “BIIE0246, a potent and highly selective non-peptide neuropeptide Y Y₂ receptor antagonist”. *Br. J. Pharmacol.* 2000; **129**: 1075-1088.

-
- * **Dumont Y, Cadieux A, Pheng LH, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R.** “Peptide YY derivatives as selective neuropeptide Y/peptide YY Y₁ and Y₂ agonists devoided of activity for the Y₃ receptor subtype”. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1994; **26** (1-2): 320-324.
 - * **Dumont Y, Martel JC, Fournier A, St-Pierre S, Quirion R.** “Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues”. *Prog. Neurobiol.* 1992; **38**: 125-167.
 - * **Edvinsson L, Ekblad E, Hakanson R, Wahlestedt C.** “Neuropeptide Y potentiates the effect of various constrictor agents on rabbit blood vessels”. *Br. J. Pharmacol.* 1984; **83**: 519-524.
 - * **Edvinsson L, Hakanson R, Wahlestedt C, Uddman R.** “Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system”. *TIPS.* 1987; **8**: 231-235.
 - * **Ehlers CL, Li TK, Lumeng L, Hwang BH, Somes C, Jiménez P, Mathé AA.** “Neuropeptide Y levels in ethanol-naive alcohol-preferring and nonpreferring rats and in Wistar rats after ethanol exposure”. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1998; **22**: 1778-1782.
 - * **Ehlers CL, Somes C, Seifritz E, Rivier JE.** “CRF/NPY interactions: a potential role in sleep dysregulation in depression and anxiety”. *Depression and Anxiety.* 1997; **6**: 1-9.
 - * **Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD.** “Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y”. *Science.* 1996; **274**: 1704-1707.
 - * **Erlige D, Edvinsson L, Brunkwall J, Yee F, Wahlestedt C.** “Human neuropeptide Y Y₁ receptor antisense oligodeoxynucleotide specifically inhibits neuropeptide Y-evoked vasoconstriction”. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; **240**: 77-80.
 - * **Escande D, Loisanche D, Planche C, Coraboeuf E.** “Age-related changes of action potential plateau shape in isolated human atrial fibers”. *Am. J. Physiol.* 1985; **249** (18): H843-H850.
 - * **Eva C, Keinänen K, Monyer H, Seeburg P, Sprengel R.** “Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor that may belong to the neuropeptide receptor family”. *FEBS Lett.* 1990; **271**: 81-84.
 - * **Eva C, Oberto A, Sprengel R, Genazzani E.** “The murine NPY-1 receptor gene. Structure and delineation of tissue-specific expression”. *FEBS Lett.* 1992; **314**: 285-288.
 - * **Fabiato A.** “Simulated calcium current can both cause calcium loading in and trigger calcium release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell”. *J. Gen. Physiol.* 1985a; **85**: 291-320.
 - * **Fabiato A.** “Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell”. *J. Gen. Physiol.* 1985b; **85**: 247-289.
 - * **Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H.** “c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization”. *J. Biol. Chem.* 2001; **276** (16): 13240-13247.
 - * **Feng Q, Lambert ML, Callow ID, Arnold JMO.** “Venous neuropeptide Y receptor responsiveness in patients with chronic heart failure”. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; **67**: 292-298.
-

-
- * **Feng Q, Sun X, Lu X, Edvinsson L, Hedner T.** “Decreased responsiveness of vascular postjunctional α_1 -, α_2 -adrenoceptors and neuropeptide Y_1 receptors in rats with heart failure”. *Acta Physiol. Scand.* 1999; **166**: 285-291.
 - * **Ferrier GR, Howlett SE.** “Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; **280**: H1928-H1944.
 - * **Ferrier GR, Redondo IM, Mason CA, Mapplebeck D, Howlett SE.** “Regulation of contraction and relaxation by membrane potential in cardiac ventricular myocytes”. *Am. J. Physiol.* 2000; **278** (Heart Circ. Physiol.): H1618-H1626.
 - * **Franco-Cereceda A, Lundberg JM, Dahlöf C.** “Neuropeptide Y and sympathetic control of heart contractility and coronary vascular tone”. *Acta Physiol. Scand.* 1985; **124**: 361-369.
 - * **Franco-Cereceda A, Saria A, Lundberg JM.** “Ischaemia and changes in contractility induce release of calcitonin gene-related peptide but not neuropeptide Y from the isolated perfused guinea-pig heart”. *Acta Physiol. Scand.* 1987; **131**: 319-320.
 - * **Frank JS, Rich TL, Beydler S, Kreman M.** “Calcium depletion in rabbit myocardium: ultrastructure of the sarcolemma and correlation with the calcium paradox”. *Cir. Res.* 1982; **51**: 117-130.
 - * **Fredholm B, Jansen I, Edvinsson L.** “Neuropeptide Y is a potent inhibitor of cyclic AMP accumulation in feline cerebral blood vessels”. *Acta. Physiol. Scand.* 1985; **124**: 467-469.
 - * **Fuhlendorff J, Gether U, Aakerlund L, Langeland-Johansen N, Thogersen H, Melberg SG, Olsen UB, Thastrup O, Schwartz TW.** “[Leu³¹,Pro³⁴] Neuropeptide Y: A specific Y_1 receptor agonist”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; **87**: 182-186.
 - * **Furukawa Y, Kim HN, Kubo T.** “Up-and down modulation of a cloned Aplysia K^+ channel (Akv1. 1a) by the activators of protein kinase C”. *Zool. Sci.* 1995; **12**: 35-44.
 - * **Gabriel S, Bierer L, Harotunin V.** “Widespread deficits in somatostatin but not NPY concentrations in Alzheimers’s disease cerebral cortex”. *Neurosci. Lett.* 1993; **155**: 116-120.
 - * **Gabriel SM, Davidson M, Haroutunian V, Powchik P, Bierer LM, Purohit DP, Perl DP, Davis KL.** “Neuropeptide deficits in schizophrenia vs. alzheimer’s disease cerebral cortex”. *Biol. Psychiatry.* 1996; **39**: 82-91.
 - * **Gehlert DR, Beavers LS, Johnson D, Gackenheimer SL, Schober DA, Gadski RA.** “Expression cloning of a human brain neuropeptide Y Y_2 receptor”. *Mol. Pharmacol.* 1996a; **49**: 224-228.
 - * **Gehlert DR, Schober DA, Beavers L, Gadski R, Hoffman JA, Smiley DL, Chance RE, Lundell I, Larhammar D.** “Characterization of the peptide binding requirements for the cloned human pancreatic polypeptide-preferring receptor”. *Mol. Pharmacol.* 1996b; **50**: 112-118.
 - * **Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL.** “A receptor subtype involved in NPY-induced food intake”. *Nature.* 1996; **382**: 168-171.

-
- * **Gicquiaux H, Lecat S, Gaire M, Dieterlen A, Mely Y, Takeda K, Bucher B, Galzi JL.** “Rapid internalization and recycling of the human neuropeptide Y Y(1) receptor”. *J. Biol. Chem.* 2002; **277** (8): 6645-6655.
 - * **Glover IK, Barlow DJ, Pitts, JE, Wood SP, Tickle IJ, Blundell TL, Tatemoto K, Kimmel JR, Wollmer A, Strassburger W, Zhang YS.** “Conformational studies on the pancreatic polypeptide hormone family”. *Eur. J. Biochem.* 1984; **142** (2): 379-385.
 - * **Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR.** “Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure”. *J. Clin. Invest.* 1995; **95**: 888-894.
 - * **Goldberg Y, Taimor G, Piper HM, Schlüter K-D.** “Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of neuropeptide Y”. *Am. J. Physiol.* 1998; **275** (Cell Physiol. 44): C1207-C1215.
 - * **Gómez AM, Bénitah J-P, Henzel D, Vinet A, Lorente P, Delgado C.** “Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle”. *Am. J. Physiol.* 1997; **272** (Heart Circ. Physiol. 41): H1078-H1086.
 - * **Gómez AM, Cheng H, Lederer WJ, Bers DM.** “Ca²⁺ diffusion and sarcoplasmic reticulum transport both contribute to [Ca²⁺]_i decline during Ca²⁺ sparks in rat ventricular myocytes”. *J. Physiol.* 1996; **496** (2): 575-581.
 - * **Gómez AM, Kerfant BG, Vassort G.** “Microtubule disruption modulates Ca²⁺ signaling in rat cardiac myocytes”. *Circ. Res.* 2000; **86**:30-36.
 - * **Gregor P, Milham ML, Feng Y, Decarr LB, McCaleb ML, Cornfield LJ.** “Cloning and characterization of a novel receptor to pancreatic polypeptide, a member of the neuropeptide Y receptor family”. *FEBS Lett.* 1996; **381**: 58-62.
 - * **Grouzmann E, Buclin T, Martire M, Cannizzaro C, Dörner B, Razaname A, Mutter M.** “Characterization of a selective antagonist of neuropeptide Y at the Y₂ receptor”. *J. Biol. Chem.* 1997; **272** (12): 7699-7706.
 - * **Grouzmann E, Meyer C, Bürki E, Brunner H.** “Neuropeptide Y Y₂ receptor signalling mechanisms in the human glioblastoma cell line LN319”. *Peptides.* 2001; **22**: 379-386.
 - * **Grundemar L, Hakanson R.** “Neuropeptide Y effector systems: perspectives for drug development”. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994; **15** (5): 153-159.
 - * **Grundemar L, Hakanson R.** “Neuropeptide Y, peptide YY and C-terminal fragments release histamine from rat peritoneal mast cells”. *Br. J. Pharmacol.* 1991; **104**: 776-778.
 - * **Grunditz T, Hakanson R, Rerup C, Sundler F, Uddman R.** “Neuropeptide Y in the thyroid gland: neuronal localization and enhancement of stimulated thyroid hormone secretion”. *Endocrinology.* 1984; **115**: 1537-1542.
 - * **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.** “A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties”. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 3440-3450.
 - * **Gu J, Adrian TE, Tatemoto K.** “Neuropeptide Tyrosine (NPY). A major cardiac neuropeptide”. *Lancet.* 1983; **1** (8332): 1008-1010.
 - * **Gu J, Polak JM, Allen JM, Huang WM, Sheppard MN, Tatemoto K, Bloom S.** “High concentrations of a novel peptide, neuropeptide Y, in the innervation of mouse and rat heart”. *J. Histochem. Cytochem.* 1984; **32** (5): 467-472.
-

-
- * **Gullestad L, Jorgensen B, Bjurø T, Pernow J, Lundberg JM, Dota C-D, Hall C, Simonsen S, Åblad B.** “Postexercise ischemia is associated with increased neuropeptide Y in patients with coronary artery disease”. *Circulation*. 2000; **102**: 987-993.
 - * **Guo H, Castro PA, Palmiter RD, Baraban SC.** “Y₅ receptors mediate neuropeptide Y actions at excitatory synapses in area CA3 of the mouse hippocampus”. *J. Neurophysiol.* 2002; **87**: 558-566.
 - * **Györke S, Fill M.** “Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in heart”. *Science*. 1993; **260**: 807-809.
 - * **Haass M, Richardt G, Brenn T, Schömig E, Schömig A.** “Nicotine-induced release of noradrenaline and neuropeptide Y in guinea-pig heart: role of calcium channels and protein kinase C”. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1991; **344**: 527-531.
 - * **Haass M, Richardt G, Schömig A.** “Potentiation of potassium-evoked noradrenaline and neuropeptide Y co-release by cardiac energy depletion: role of calcium channels and sodium-proton exchange”. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1992; **346**: 410-418.
 - * **Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M.** “Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells”. *J. Physiol.* 1988; **395**: 233-253.
 - * **Halawa B, Salomon P.** “Plasma levels of neuropeptide Y in patients with current myocardial infarction”. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2001; **105** (2): 117-122.
 - * **Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ.** “Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches”. *Plügers Arch.* 1981; **391**: 85-100.
 - * **Han C, Wang X, Fiscus RR, Gu J, McDonald JK.** “Changes in cardiac neuropeptide Y after experimental myocardial infarction in rat”. *Neuroscience Letters*. 1989; **104**: 141-146.
 - * **Han W, Barr SC, Pacioretty LM, Gilmour RF.** “Restoration of the transient outward potassium current by noradrenaline in chagasic canine epicardium”. *J. Physiol.* 1997; **500** (1): 75-83.
 - * **Hashim MA, Harrington WW, Daniels AJ, Tadepalli AS.** “Hemodynamic profile of neuropeptide Y in dogs: effect of ganglionic blockade”. *Peptides*. 1997; **18** (2): 235-239.
 - * **Hauser GJ, Danchak MR, Colvin MP, Hopkins RA, Wocial B, Myers AK, Zukowska-Grojec Z.** “Circulating neuropeptide Y in humans: relation to changes in catecholamine levels and changes in hemodynamics”. *Neuropeptides*. 1996; **30** (2): 159-165.
 - * **Heilig M, Widerlöv E.** “Neuropeptide Y: an overview of central distribution, functional aspects, and possible involvement in neuropsychiatric illnesses”. *Acta Psych. Scand.* 1990; **82**: 95-114.
 - * **Heredia MP, Fernández-Velasco M, Benito G, Delgado C.** “Neuropeptide Y increases 4-aminopyridine-sensitive transient outward potassium current in rat ventricular myocytes”. *Br. J. Pharmacol.* 2002, in press.
 - * **Herzog H, Baumgartner M, Vivero C, Selbie LA, Auer B, Shine J.** “Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y₁ receptor”. *J. Biol. Chem.* 1993; **268**: 6703-6707.

-
- * **Hess P, Tsien RW.** “Mechanism of ion permeation through calcium channels”. *Nature*. 1984; **309**: 453-456.
 - * **Higuchi H, Yang H-YT, Sabol SL.** “Rat neuropeptide Y precursor gene expression”. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 6288-6295.
 - * **Hirabayashi A, Nishiwaki K, Shimada Y, Ishikawa N.** “Role of neuropeptide Y and its receptor subtypes in neurogenic pulmonary edema”. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; **296** (3): 297-305.
 - * **Hiraoka M, Kawano S.** “Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes”. *J. Physiol.* 1989; **410**: 187-212.
 - * **Horike K, Yoshizumi M, Kitagawa T, Itoh K, Houchi H, Tamaki T, Katoh I.** “Neuropeptide Y as a stimulator of Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux from freshly isolated adult rat cardiomyocytes”. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1997; **356**: 756-762.
 - * **Horn R, Marty A.** “Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method”. *J. Gen. Physiol.* 1988; **92**: 145-159.
 - * **Hove-Madsen L, Bers DM.** “Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and thapsigargin sensitivity in permeabilized rabbit and rat ventricular myocytes”. *Circ. Res.* 1993; **73**: 820-828.
 - * **Hu Y, Bloomquist BT, Cornfield LJ, Decarr LB, Flores-Riveros JR, Friedman L, Jiang P, Lewis-Higgins L, Sadlowski Y, Schaefer J, Velázquez N, McCaleb ML.** “Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior”. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 26315-26319.
 - * **Hulting J, Sollevi A, Ullman B, Franco-Cereceda A, Lundberg JM.** “Plasma neuropeptide Y on admission to a coronary care unit: raised levels in patients with left heart failure”. *Cardiovasc. Res.* 1990; **24**: 102-108.
 - * **Hume JR, Uehara A.** “Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes”. *J. Physiol.* 1985; **368**: 525-544.
 - * **Hwang BH, Zhang JK, Ehlers CL, Lumeng L, Li TK.** “Innate differences of neuropeptide Y (NPY) in hypothalamic nuclei and central nucleus of the amygdala between selectively bred rats with high and low alcohol preference”. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1999; **23** (6): 1023-1030.
 - * **Jacques D, Sader S, El-Bizri N, Chouffani S, Hassan G, Shbaklo H.** “Neuropeptide Y induced increase of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in heart and vascular smooth muscle cells”. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2000; **78**: 162-172.
 - * **Jalife J, Delmar M, Davidenko JM, Anumonwo JMB.** “Ion channels”. En: “Basic cardiac electrophysiology for the clinician”. Armonk, NY: Futura Publishing C., Inc. 1999. Nueva York.
 - * **Jahnel U, Klemm P, Nawrath H.** “Different mechanisms of the inhibition of the transient outward current in rat ventricular myocytes”. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1994; **349**: 87-94.
 - * **Kaga T, Fujimiya M, Inui A.** “Emerging functions of neuropeptide Y Y₂ receptors in the brain”. *Peptides*. 2001; **22**: 501-506.
 - * **Kalra S, Kalra P.** “Nutritional infertility: the role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network”. *Front. Neuroendocrinol.* 1996; **17**: 371-401.

-
- * **Kamimura N, Suga S, Nakano K, Kanno T, Takeo T, Wakui M.** “Protein kinase C-dependent inhibition of K⁺ currents in noradrenaline-induced depolarization of smooth muscle of guinea-pig vas deferens”. *Exp. Physiol.* 2000; **85** (1): 37-42.
 - * **Kanatani A, Hata M, Mashiko S, Ishihara A, Okamoto O, Haga Y, Ohe T, Kanno T, Murai N, Ishii Y, Fukuroda T, Fukami T, Ihara M.** “A typical Y₁ receptor regulates feeding behaviors: effects of a potent and selective Y₁ antagonist, J-115814”. *Mol. Pharmacol.* 2001; **59**: 501-505.
 - * **Kanatani A, Ishihara A, Iwaasa H, Nakamura K, Okamoto O, Hidaka M, Ito J, Fukuroda T, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Ishii Yk, Okabe T, Fukami T, Ihara M.** “L-152,804: orally active and selective neuropeptide Y Y₅ receptor antagonist”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000a; **272** (1): 169-173.
 - * **Kanatani A, Mashiko S, Murai N, Sugimoto N, Ito J, Fukuroda T, Fukami T, Morin N, McNeil DJ, Van der Ploeg LH, Saga Y, Nishimura S, Ihara M.** “Role of the Y₁ receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y₁ receptor-deficient, and Y₅ receptor-deficient mice”. *Endocrinology.* 2000b; **141**: 1011-1016.
 - * **Kask A, Rago L, Harro J.** “Alpha-helical CRF(9-41) prevents anxiogenic-like effect of NPY Y1 receptor antagonist BIBP3226 in rats”. *Neuroreport.* 1997; **8**: 3645-3647.
 - * **Kassis S, Olasmaa M, Terenius L, Fishman PH.** “Neuropeptide Y inhibits cardiac adenylate cyclase through a pertussis toxin-sensitive G protein”. *J. Biol. Chem.* 1987; **262** (8): 3429-3431.
 - * **Katz AM.** “A growth of ideas: role of calcium as activator of cardiac contraction”. *Cardiovasc. Res.* 2001; **52**: 8-13.
 - * **Katz AM.** “Excitation-contraction coupling. Calcium fluxes across the sarcoplasmic reticulum and mitochondria”. In: *Physiology of the Heart.* A.M. Katz (ed). Raven Press. 1992. New York
 - * **Kawamura A, Wahler GM.** “Perforated-patch recording does not enhance effect of 3-isobutyl-1-methylxanthine on cardiac calcium current”. *Am. J. Physiol.* 1994; **266** (Cell Physiol. 35): C1619-C1627.
 - * **Kaye WH, Berrettini WH, Gwirtsman HE, George DT.** “Altered cerebrospinal fluid neuropeptide Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa”. *Arch. Gen. Psychiatry.* 1990; **47**: 548-556.
 - * **Kelley SP, Nannini MA, Bratt AM, Hodge CW.** “Neuropeptide Y in the paraventricular nucleus increases ethanol self-administration”. *Peptides.* 2001; **22**: 515-522.
 - * **Kentish JC, Barsotti RJ, Lea TJ, Mulligan IP, Patel JR, Ferenczi MA.** “Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum induced by photorelease of calcium or Ins(1,4,5)P₃”. *Am. J. Physiol.* 1990; **258** (2 pt 2): H610-H615.
 - * **Kerfant BG, Vassort G, Gómez AM.** “Microtubule disruption by colchicine reversibly enhances calcium signaling in intact rat cardiac myocytes”. *Circ. Res.* 2001; **88**: e59-e65.
 - * **Kimmel JR, Hayden LJ, Pollock HG.** “Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone”. *J. Biol. Chem.* 1975; **250**: 9369-9376.
 - * **Kimmel JR, Pollock HG, Hazelwood RL.** “Isolation and characterization of chicken insulin”. *Endocrinology.* 1968; **83**:1323-1330.
-

-
- * **Kleiman RB, Houser SR.** “Calcium currents in normal and hypertrophied isolated feline myocytes”. *Am. J. Physiol.* 1988; **255**: H1434-H1442.
 - * **Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T.** “Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; **159** (2): 548-553.
 - * **Kohmoto O, Levi AJ, Bridge JH.** “Relation between reverse sodium-calcium exchange and sarcoplasmic reticulum calcium release in guinea pig ventricular cells”. *Circ. Res.* 1994; **74**: 550-554.
 - * **Kralios FA, Anderson FL, Hanson GR, Kralios AC.** “Myocardial electrophysiological effects of neuropeptide Y in dogs”. *Am. J. Physiol.* 1995; **268** (37): H2195-H2101.
 - * **Lamb GD.** “Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle”. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2000; **27** (3): 216-224.
 - * **Lambeir AM, Durinx C, Proost P, Van Damme J, Scharpe S, De Meester I.** “Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase IV/CD26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion”. *FEBS Lett.* 2001; **507** (3): 327-330.
 - * **Lambert ML, Callow ID, Feng QP, Arnold MO.** “The effects of age on human venous responsiveness to neuropeptide Y”. *Br J. Clin. Pharmacol.* 1999; **47**: 83-89.
 - * **Langer GA.** “Chasing myocardial calcium: a 35-year perspective”. *News Physiol. Sci.* 1997; **12**: 238-244.
 - * **Larhammar D, Blomqvist AG, Yee F, Jazin E, Yoo H, Wahlestedt C.** “Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y₁ type”. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 10935-10938.
 - * **Larhammar D.** “Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide”. *Regul. Pept.* 1996; **62**: 1-11.
 - * **Larsen PJ, Jukes KE, Chowdrey HS, Lightman SL, Jessop DS.** “Neuropeptide Y potentiates the secretion of vasopressin from the neurointermediate lobe of the rat pituitary gland” *Endocrinology.* 1994; **134**: 1635-1639.
 - * **Larsen PJ, Sheikh SP, Jakobsen CR, Schwartz TW, Mikkelsen JD.** “Regional distribution of putative NPY Y₁ receptors and neurons expressing Y₁ mRNA in forebrain areas of the rat central nervous system”. *Eur. Neurosci.* 1993; **5**: 1622-1637.
 - * **Leaney JL, Tinker A.** “The role of members of the pertussis toxin-sensitive family of G proteins in coupling receptors to the activation of the G protein-gated inwardly rectifying potassium channel”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97** (10): 5651-5656.
 - * **Leblanc N, Hume JR.** “Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum”. *Science.* 1990; **248**: 372-376.
 - * **Lederer WJ, Niggli E, Hadley RW.** “Sodium-calcium exchange in excitable cells: fuzzy space”. *Science.* 1990; **248**: 283.
 - * **Lee JE, Bokoch G, Liang BT.** “A novel cardioprotective role of RhoA: new signaling mechanism for adenosine”. *FASEB J.* 2001; **15**: 1886-1894.
 - * **Lee KS, Tsien RW.** “Reversal of current through calcium channels in dialyzed single heart cells”. *Nature.* 1982; **297**: 500.
-

-
- * **Lefevre IA, Coulombe A, Coraboeuf E.** “The calcium antagonist D600 inhibits calcium-independent transient outward current in isolated rat ventricular myocytes”. *J. Physiol.* 1991; **432**: 65-80.
 - * **Lemaire S, Piot C, Seguin J, Nargeot J, Richard S.** “Tetrodotoxin-sensitive Ca^{2+} and Ba^{2+} currents in human atrial cells”. *Recept. Channels.* 1995; **3**: 71-81.
 - * **Leonardi A, Sironi G, Motta G.** “Receptors in cardiovascular disease: review and introduction”. *Pharm. Acta Helv.* 2000; **74** (2-3): 157-161.
 - * **Levesque PC, Leblanc N, Hume JR.** “Release of calcium from guinea pig cardiac sarcoplasmic reticulum induced by sodium-calcium exchange”. *Cardiovasc. Res.* 1994; **28**: 370-378.
 - * **Levi AJ, Spitzer KW, Kohmoto O, Bridge JHB.** “Depolarization-induced Ca^{2+} entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange triggers SR release in guinea pig cardiac myocytes “. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: H1422-H1433.
 - * **Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S.** “Evidence for two components of delayed rectifier K^+ current in human ventricular myocytes”. *Circ. Res.* 1996; **78**: 689-696.
 - * **Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM.** “Cardiac myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects”. *Am. J. Physiol.* 1998; **274**: H1335-H1347.
 - * **Lindau M, Fernández JM.** “IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels”. *Nature.* 1986; **319**: 150-153.
 - * **Lindblad DS, Murphuy CR, Clark JE, Giles WR.** “A model of the action potential and underlying membrane currents in a rabbit atrial cell”. *Am. J. Physiol.* 1996; **271** (4 Pt2): H1666-H1696.
 - * **Liposits Z, Sievers L, Paull WK.** “Neuropeptide Y and ACTH-immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. An immunocytochemical analysis at the light and electron microscopic levels”. *Histochem.* 1988; **88**: 227-234.
 - * **Lipp P, Niggli E.** “Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes”. *J. Physiol.* 1994; **474**: 439-446.
 - * **Litwin SE, Li J, Bridge JHB.** “ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and the trigger for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release: studies in adult rabbit ventricular myocytes”. *Biophys. J.* 1998; **75**: 359-371.
 - * **Liu SJ, Kennedy RH.** “ α_1 -adrenergic activation of L-type Ca^{2+} current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings”. *Am. Physiol. Soc.* 1998; H2203-H2207.
 - * **Lo CF, Numann R.** “Independent and exclusive modulation of cardiac delayed rectifying K^+ current by protein kinase C and protein kinase A”. *Circ. Res.* 1998; **83**: 995-1002.
 - * **Lobaugh LA, Blackshear PJ.** “Neuropeptide Y stimulation of myosin light chain phosphorylation in cultured aortic smooth muscle cells”. *J. Biol. Chem.* 1990; **265** (30): 18393-18399.
 - * **Lompré AM, Anger M, Levitsky D.** “Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression”. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994; **26**: 1109-1121.

-
- * **López-López JR, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG.** “Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells”. *Science*. 1995; **268**: 1042-1045.
 - * **Love S, Nyquist-Battie C, DiMaggio DA, Farah JM, Chronwall BM.** “Diminished neuropeptide Y and dopanin β-hydroxylase immunoreactivity in a guinea pig model of left ventricular hypertrophy”. *Cardiovas. Res.* 1993; **27**: 494-499.
 - * **Lundberg JM, Hua XY, Franco-Cereceda A.** “Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig”. *Acta Physiol. Scand.* 1984; **121**: 325-332.
 - * **Lundberg JM, Tatemoto K.** “Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α-adrenoceptor blockade”. *Acta Physiol. Scand.* 1982; **116**: 393-402.
 - * **Lundell I, Blomqvist AG, Berglund MM, Schober DA, Johnson D, Statnick MA, Gadski RA, Gehlert DR, Larhammar D.** “Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY”. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 29123-29128.
 - * **Lundell I, Statnick MA, Johnson D, Schober DA, Starbäck P, Gehlert DR, Larhammar D.** “The cloned rat pancreatic polypeptide receptor exhibits profound differences to the orthologous human receptor”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; **93**: 5111-5115.
 - * **Luo W, Grupp IL, Harrer J.** “Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation”. *Circ. Res.* 1994; **75**: 401-409.
 - * **Magni P, Barnea A.** “An early and transient period of protein synthesis is required for induction of neuropeptide Y-mRNA by phorbol ester and forskolin in aggregate cultures of fetal brain cells”. *Mol. Cell. Endo.* 1993; **94**: 205-211.
 - * **Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Martini L, Motta M.** “Control of the expression of human neuropeptide Y by leptin: in vitro studies”. *Peptides.* 2001; **22**: 415-420.
 - * **Malmström RE, Balmér KC, Weilitz J, Nordlander M, Sjölander M.** “Pharmacology of H394/84, a dihydropyridine neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist, in vivo”. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; **418**: 95-104.
 - * **Maltsev VA, Ji GJ, Wobus AM, Fleischmann BK, Hescheler J.** “Establishment of β-adrenergic modulation of L-type Ca²⁺ current in the early stages of cardiomyocyte development”. *Circ. Res.* 1999; **84**: 136-145.
 - * **Marsh DJ, Hollopeter G, Kafer KE, Palmiter RD.** “Role of the Y₅ neuropeptide Y receptor in feeding and obesity”. *Nat. Med.* 1998; **4** (6): 718-721.
 - * **Martínez ML, Heredia MP, Delgado C.** “Expression of T-type Ca²⁺ channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts”. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999; **31**: 1617-1625.
 - * **Martire M, Pistritto G, Mores N, Agnati LF, Fuxe K.** “Region-specific inhibition of potassium-evoked [3H]noradrenaline release from rat brain synaptosomes by neuropeptide Y(13-36). Involvement of NPY receptors of the Y₂ type”. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; **230**: 231-234.

-
- * **Marty A, Neher E.** “Tight seal whole cell recording”. En “Single channel recording”. Ed. Sackman B y Neher E. Plenum Press NY, 1983.
 - * **Marx SO, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Henrikson C, Ondrias K, Marks AR.** “Coupled gating between cardiac calcium release channels (Ryanodine Receptors)”. *Circ. Res.* 2001; **88**: 1151-1158.
 - * **Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR.** “PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (Ryanodine Receptor): defective regulation in failing hearts”. *Cell.* 2000; **101**: 365-376.
 - * **Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I.** “Central cardiovascular action of neuropeptide Y in conscious rabbits”. *Hypertension.* 2000; **36**: 1040-1044.
 - * **Matsura H, Ehara T.** “Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells”. *Circ. Res.* 1992; **70**: 851-855.
 - * **McCarthy HD, Kilpatrick AP, Trayhurn P, Williams G.** “Widespread increases in regional hypothalamic neuropeptide Y levels in acute cold exposed rats”. *Neuroscience.* 1993; **54** (1): 127-132.
 - * **McCullough LA, Egan TM, Westfall TC.** “Neuropeptide Y inhibition of calcium channels in PC-12 pheochromocytoma cells”. *Am. J. Physiol.* 1998; **274** (43): C1290-C1297.
 - * **McDermott BJ, Millar BC, Dolan FM, Bell D, Balasubramaniam A.** “Evidence for Y₁ and Y₂ subtypes of neuropeptide Y receptors linked to opposing postjunctional effects observed in rat cardiac myocytes”. *Eur. J. Pharmacol.* 1997; **336**: 257-265.
 - * **McDermott BJ, Millar BC, Piper HM.** “Cardiovascular effects of neuropeptide Y: receptor interactions and cellular mechanisms”. *Cardiovasc. Res.* 1993; **27**: 893-905.
 - * **McDonald TF, Cavalié A, Trautwein W, Pelzer D.** “Voltage-dependent properties of macroscopic and elementary calcium channel currents in guinea pig ventricular myocytes”. *Pflügers Arch.* 1986; **406**: 437-448.
 - * **McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer D.** “Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells”. *Physiol. Rev.* 1994; **74** (2): 365-507.
 - * **McLeod AG, Shen ACY, Campbell KP.** “Frog cardiac calsequestrin. Identification, characterization, and subcellular distribution in two structurally distinct regions of peripheral sarcoplasmic reticulum in frog ventricular myocardium”. *Circ. Res.* 1991; **69**: 344-359.
 - * **McQuiston AR, Petrozzino JJ, Connor JA, Colmers WF.** “Neuropeptide Y receptors inhibit N type Ca²⁺ currents and reduce transient calcium increases in rat dentate granule cells”. *J. Neurosci.* 1996; **166**: 1422-1429.
 - * **Mende U, Kagen, A, Meister M, Neer EJ.** “Signal transduction in atria and ventricles of mice with transient cardiac expression of activated G protein α_q ”. *Circ. Res.* 1999; **85**: 1085-1091.
 - * **Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P.** “Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus”. *J. Neuroendocrinol.* 1996; **8**: 733-735.

-
- * **Meyers MB, Puri TS, Chien AJ, Gao T, Hsu PH; Hosey MM, Fishman GI.** “Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels”. *J. Biol. Chem.* 1998; **273** (30): 18930-18935.
 - * **Michalkiewicz M, Michalkiewicz T, Kreulen DL, McDougall SJ.** “Increased blood pressure responses in neuropeptide Y transgenic rats”. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2001; **281**: R417-R426.
 - * **Michel MC.** “Receptors for neuropeptide Y: multiple subtypes and multiple second messengers”. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1991; **12**: 389-394.
 - * **Michel MC.** “Rapid desensitization of adrenaline- and neuropeptide Y-stimulated Ca²⁺ mobilization in HEL-cells”. *Br. J. Pharmacol.* 1994; **112**: 499-504.
 - * **Michel MC, Beck-Sickinger A, Cox H, Doods HN, Herzog H, Larhammar D, Quirion R, Schwartz T, Westfall T.** “International union of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors”. *Pharmacol. Rev.* 1998; **50** (1): 143-150.
 - * **Michel MC, Rascher W.** “Neuropeptide Y: a possible role in hypertension?”. *J. Hypertension.* 1995; **13**: 385-395.
 - * **Michel MC, Schlicker E, Fink K, Boublik JH, Göthert M, Willette RN, Daly RN, Hieble JP, Rivier JE, Motulsky HJ.** “Distinction of NPY receptors in vitro and in vivo. I. NPY-(18-36) discriminates NPY receptor subtypes in vitro”. *Am. J. Physiol.* 1990; **259**: E131-E139.
 - * **Mihara S-I, Shigeri Y, Fujimoto M.** “Neuropeptide Y-induced intracellular Ca²⁺ increases in vascular smooth muscle cells”. *FEBS Letters.* 1989; **259** (1): 79-82.
 - * **Millar BC, Piper HM, McDermott BJ.** “The antiadrenergic effect of neuropeptide Y on the ventricular cardiomyocyte”. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* 1988; **338**: 426-429.
 - * **Millar BC, Schlüter KD, Zhou XJ, McDermott BJ, Piper M.** “Neuropeptide Y stimulates hypertrophy of adult ventricular cardiomyocytes”. *Am. J. Physiol.* 1994; **266**: C1271-C1277.
 - * **Millar BC, Weis T, Piper HM, Weber M, Borchard U, McDermott BJ, Balasubramaniam A.** “Positive and negative contractile effects of neuropeptide Y on ventricular cardiomyocytes”. *Am. J. Physiol.* 1991; **261** (30): H1727-H 1733.
 - * **Minami S, Kamegai J, Sugihara H, Suzuki N, Higuchi H, Wakabayashi I.** “Central glucoprivation evoked by the administration of 2-deoxy-D-glucose induces expression of the c-fos gene in a sub population of neuropeptide Y neurones in the rat hypothalamus”. *Mol. Brain. Res.* 1995; **33**: 305-310.
 - * **Minth CD, Andrews PC, Dixon JE.** “Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene”. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 11974-11979.
 - * **Minthon L, Edvinsson L, Gustafson L.** “Somatostatin and neuropeptide Y in cerebrospinal fluid: correlations with severity of disease and clinical signs in Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia”. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1997; **8** (4): 232-239.
 - * **Minth-Worby CA.** “Transcriptional regulation of the human neuropeptide Y gene by nerve growth factor”. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 15460-15468.
-

-
- * **Morad M, Suzuki YJ.** “Ca²⁺ signaling in cardiac myocytes: evidence from evolutionary and transgenic models”. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997; **430**: 3-12.
 - * **Morgan CA, Wang S, Southwick SM, Rasmusson A, Hazlett G, Hauger RL, Charmey DS.** “Plasma neuropeptide Y concentrations in humans exposed to military survival training”. *Biol. Psychiatry.* 2000; **47** (10): 902-909.
 - * **Morris MJ, Cox HS, Lambert GW.** “Regional-specific neuropeptide Y overflows at rest and during sympathetic activation in humans”. *Hypertension.* 1997; **29**: 137-143.
 - * **Motulsky H, Michel MC.** “Neuropeptide Y mobilizes Ca²⁺ and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells”. *Am. J. Physiol.* 1988; **255** (Endocrinol. Metab. 18): E880-E885.
 - * **Mullins D, Kirby D, Hwa J, Guzzi M, Rivier J, Parker E.** “Identification of potent and selective neuropeptide Y Y₁ receptor agonists with orexigenic activity in vivo”. *Mol. Pharmacol.* 2001; **60** (3): 534-540.
 - * **Munglani R, Hudspith MJ, Hunt SP.** “The therapeutic potential of neuropeptide Y. Analgesic, anxiolytic and antihypertensive”. *Drugs.* 1996; **52** (3): 371-389.
 - * **Murakoshi H, Shi G, Scannevin RH, Trimmer JS.** “Phosphorylation of the Kv2.1 K⁺ channel alters voltage-dependent activation”. *Mol. Pharmacol.* 1997; **52**: 821-828.
 - * **Murray KT, Fahrig SA, Deal KK, Po SS, Hu NN, Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB.** “Modulation of an inactivating human cardiac K⁺ channel by protein kinase C”. *Circ. Res.* 1994; **75** (6): 999-1005.
 - * **Näbauer M, Callewart G, Cleeman L, Morad M.** “Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac, myocytes”. *Science.* 1989; **244**: 800-803.
 - * **Näbauer M, Kääb S.** “Potassium channel downregulation in heart failure”. *Cardiovasc. Res.* 1998; **37**: 324-334.
 - * **Nakamura M, Sakanaka C, Aoki Y, Ogasawara H, Tsuji T, Kodama H, Matsumoto T, Shimizu t, Noma M.** “Identification of two isoforms of mouse neuropeptide Y-Y₁ receptor generated by alternative splicing”. *J. Biol. Chem.* 1995; **270** (50): 30102-30110.
 - * **Nakamura TY, Coetzee WA, Vega-Saenz de Miera E, Artman M, Rudy B.** “Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward K⁺ current, by PKC”. *Am. J. Physiol.* 1997; **273** (Heart Circ. Physiol. 42): H1775-H1786.
 - * **Narnaware YK, Peyon PP, Lin X, Peter RE.** “Regulation of food intake by neuropeptide Y in goldfish”. *Am J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 2000; **279**: R1025-R1034.
 - * **Naruse K, King GL.** “Protein kinase C and myocardial biology and function”. *Circ. Res.* 2000; **86**: 1104-1106.
 - * **Neher E, Sakmann B, Steinbach JH.** “The extracellular patch clamp: a method for resolving current through individual open channels in biological membranes”. *Pflügers Arch.* 1978; **375**: 219-228.
 - * **Nerbonne JM.** “Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium”. *J. Physiol.* 2000; **525** (2): 285-298.
 - * **Nie M, Selbie LA.** “Neuropeptide Y Y₁ and Y₂ receptor-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase activity”. *Regul. Peptides.* 1998; **75-76**: 207-213.
-

-
- * **Nilsson CL, Brinkmalm A, Minthon L, Blennow K, Ekman R.** “Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia”. *Peptides*. 2001; **22**: 2105-2112.
 - * **Nilsson CL, Karlsson G, Blennow K, Heilig M, Ekman R.** “Differences in the neuropeptide Y-like immunoreactivity of the plasma and platelets of human volunteers and depressed patients”. *Peptides*. 1996; **17** (3): 359-362.
 - * **Nyquist-Battie C, Cochran P, Chronwall BM.** “Differential effects of high salt intake on neuropeptide Y and adrenergic markers in hearts of Dahl rats”. *Peptides*. 1998; **19** (8): 1377-1383.
 - * **Onuoha GN, Nicholls DP, Alpar EK, Ritchie A, Shaw C, Buchanan K.** “Regulatory peptides in the heart and major vessels of man and mammals”. *Neuropeptides*. 1999; **33** (2): 165-172.
 - * **Onuoha GN, Nugent A-M, Hunter SJ, Alpar EK, McEneaney DJ, Campbell NPS, Shaw C, Buchanan KD, Nicholls DP.** “Neuropeptide variability in man”. *Eur. J. Clin Invest*. 2000; **30** (7): 570-577.
 - * **Opie LH.** “The heart physiology, from cell to circulation”. Ed Lippincott-Raven. 1998. Philadelphia.
 - * **Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramírez RJ, Zobel C, Backx PH.** “The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (I_{to}) in normal and diseased myocardium”. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2001; **33**: 851-872.
 - * **Parker EM, Balasubramaniam A, Guzzi M, Mullins DE, Salisbury BG, Sheriff S, Witten MB, Hwa JJ.** “[D-Trp³⁴] neuropeptide Y is a potent and selective neuropeptide Y Y₅ receptor agonist with dramatic effects on food intake”. *Peptides*. 2000; **21**: 393-399.
 - * **Pedrazzini T, Seydoux J, Künstner P, Aubert J-F, Grouzmann E, Beermann F, Brunner H-R.** “Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor”. *Nature Med*. 1998; **4** (6): 722-726.
 - * **Pellieux C, Sauthier T, Domenighetti A, Marsh DJ, Palmiter RD, Brunner HR, Pedrazzini T.** “Neuropeptide Y (NPY) potentiates phenylephrine-induced mitogen-activated protein kinase activation in primary cardiomyocytes via NPY Y₅ receptors”. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2000; **97** (4): 1595-1600.
 - * **Pelzer D, Pelzer S, McDonald TF.** “Properties and regulation of calcium channels in muscle cells”. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*. 1990; **114**: 107-207.
 - * **Pérez PJ, Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA.** “Identification and functional reconstitution of the type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from ventricular cardiac myocytes”. *J. Biol. Chem*. 1997; **272**: 23961-23969.
 - * **Pernow J, Lundberg JM, Kaijser L.** “Vasoconstrictor effects in vivo and plasma disappearance rate of neuropeptide Y in man”. *Life Sci*. 1987; **40**:47-54.
 - * **Peterson BZ, DeMaría CD, Adelman JP, Yue DT.** “Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels”. *Neuron*. 1999; **22**: 549-558.
 - * **Pheng LH, Regoli D.** “Receptors for NPY in peripheral tissues. Bioassays”. *Life Sci*. 2000; **67**: 847-862.
 - * **Piacentino VIII, Dipla K, Gaughan JP, Houser SR.** “Voltage-dependent Ca²⁺ release from the SR of feline ventricular myocytes is explained by Ca²⁺-induced Ca²⁺ release”. *J. Physiol*. 2000; **523**: 533-548.
-

-
- * **Pierroz DD, Aebi AC, Huhtaniemi IT, Aurbert ML.** “Many LH peaks are needed to physiologically stimulate testosterone secretion: modulation by fasting and NPY”. *Am. J. Physiol.* 1999; **276**: E603-610.
 - * **Piper HM, Millar BC, McDermott BJ.** “The negative inotropic effect of neuropeptide Y on the ventricular cardiomyocyte”. *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch. Pharmacol.* 1989; **340**: 333-337.
 - * **Piper HM.** “The calcium paradox revisited: An artefact of great heuristic value”. *Cardiovasc. Res.* 2000; **45**: 123-127.
 - * **Playford RJ, Cox HM.** “Peptide YY and neuropeptide Y: Two peptides intimately involved in electrolyte homeostasis”. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996; **17**: 436-438.
 - * **Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM.** “Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. Role of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual β -adrenergic responsiveness”. *Circ. Res.* 2001; **88**: 1159-1167.
 - * **Polgár E, Shehab SAS, Watt C, Todd AJ.** “GABAergic neurons that contain neuropeptide Y selectively target cells with the neurokinin 1 receptor in laminae III and IV of the rat spinal cord”. *J. Neurosci.* 1999; **19** (7): 2637-2646.
 - * **Potter EK, Ulman LG.** “Neuropeptides in sympathetic nerves affect vagal regulation of the heart”. *News Physiol. Soc.* 1994; **9**: 174-177.
 - * **Prieto D, Buus C, Mulvany MJ, Nilsson H.** “Interactions between neuropeptide Y and the adenylate cyclase pathway in rat mesenteric small arteries: role of membrane potential”. *J. Physiol.* 1997; **502** (2): 281-292.
 - * **Prieto D, Buus CL, Mulvany MJ, Nilsson H.** “Neuropeptide Y regulates intracellular calcium through different signalling pathways linked to a Y1-receptor in rat mesenteric small arteries”. *Br. J. Pharmacol.* 2000; **129**: 1689-1699.
 - * **Protas L, Robinson RB.** “Neuropeptide Y contributes to innervation-dependent increase in I_{CaL} via ventricular Y_2 receptors”. *Am. J. Physiol.* 1999; **277** (Heart Circ. Physiol. 46): H940-H946.
 - * **Puglisi JL, Yuan W, Bassani JWM, Bers DM.** “ Ca^{2+} influx through Ca^{2+} channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature”. *Circ. Res.* 1999; **85**: c7-c16.
 - * **Qin N, Olcese R, Bransby M, Lin T, Birnbaumer L.** “ Ca^{2+} -induced inhibition of the cardiac Ca^{2+} channel depends on calmodulin”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; **96**: 2435-2438.
 - * **Qu J, Cohen IS, Robinson RB.** “Sympathetic innervation alters activation of pacemaker current (I_f) in rat ventricle”. *J. Physiol.* 2000; **523** (3): 561-569.
 - * **Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M.** “Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B”. *J. Neurosci. Methods.* 1991; **37**: 15-26.
 - * **Redrobe JP, Dumont Y, St-Pierre JA, Quirion R.** “Multiple receptors for neuropeptide Y in the hippocampus: putative roles in seizures and cognition”. *Brain Res.* 1999; **848**: 153-166.
 - * **Reuter M, Scholz H.** “A study of the ion selectivity and the kinetics properties of the calcium current in mammalian cardiac muscle”. *J. Physiol.* 1977; **264**: 17-47.
-

-
- * **Rhim H, Kinney GA, Emmerson PJ, Miller RJ.** “Regulation of neurotransmission in the arcuate nucleus of the rat by different neuropeptide Y receptors”. *J. Neurosci.* 1997; **17**: 2980-2989.
 - * **Rigel DF, Grupp IL, Balasubramaniam A, Grupp G.** “Contractile effects of cardiac neuropeptides in isolated canine atrial and ventricular muscles”. *Am. J. Physiol.* 1989; **257** (Heart Circ. Physiol. 26): H1082-H1087.
 - * **Rigel DF.** “Effects of neuropeptides on heart rate in dogs: comparison of VIP, PHI, NPY, CGRP, and NT”. *Am. J. Physiol.* 1988; **275** (Heart Circ. Physiol. 24): H311-H317.
 - * **Ritter M, Su Z, Spitzer W, Ishida H, Barry WH.** “Caffeine-induced Ca^{2+} sparks in mouse ventricular myocytes”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; **278**: H666-H669.
 - * **Roberts TJ, Caston-Balderrama A, Nijland MJ, Ross MG.** “Central neuropeptide Y stimulates ingestive behavior and increases urine output in the ovine fetus”. *Am. J. Physiol.* 2000; **279**: E494-E500.
 - * **Rogers P, McKibbin PE, Williams G.** “Acute fenfluramine administration reduces neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of the rat: possible implications for the anorectic effect of fenfluramine”. *Peptides.* 1991; **12**: 251-255.
 - * **Roscoe AK, Nyce J, Wooles WR.** “Intravenous NPY (27-36)-D decreases cardiac output in conscious Sprague-Dawley rats”. *Peptides.* 1996; **17** (3): 539-543.
 - * **Rose PM, Fernandes P, Lynch JS, Frazier ST, Fisher SM, Kodukula K, Kienzle B, Seethala R.** “Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor”. *Am. Soc. Biochem. Mol. Biol.* 1995; **270** (39): 22661-22664.
 - * **Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, William KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck-Sickinger AG, Doods HN.** “The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide Y Y_1 receptor antagonist: BIBP3226”. *Eur. J. Pharmacol.* 1994; **271**: R11-R13.
 - * **Rudski JM, Crace M, Kuskowski M, Billington C, Levine A.** “Behavioral effects of naloxone on neuropeptide Y-induced feeding”. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996; **54**: 771-777.
 - * **Sabol SL, Higuchi H.** “Transcriptional regulation of the neuropeptide Y gene by nerve growth factor: antagonism by glucocorticoids and potentiation by adenosine 3',5'-monophosphate and phorbol ester”. *Mol. Endocrinol.* 1990; **4**: 384-392.
 - * **Sahu A, Kalra PS, Kalra SP.** “Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus”. *Peptides.* 1988; **9**: 83-86.
 - * **Sahu A, Phelps CP, White JD, Crowley WR, Kalra SP, Kalra PS.** “Steroidal regulation of hypothalamic neuropeptide Y release and gene expression”. *Endocrinology.* 1992; **130**: 3331-3336.
 - * **Sajdyk TJ, Vandergriff MG, Gehlert DR.** “Amygdalar neuropeptide Y Y_1 receptors mediate the anxiolytic-like actions of neuropeptide Y in the social interaction test”. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; **368**: 143-147.
 - * **Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK.** “Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells”. *Am. J. Physiol.* 1991; **260**: H393-H399.

-
- * **Santana LF, Gómez AM, Lederer WJ.** “Ca²⁺ flux through promiscuous cardiac Na⁺ channels: slip-mode conductance”. *Science*. 1998; **279**: 1027-1033.
 - * **Santana, LF, Cheng H, Gómez AM, Cannell MB, Lederer WJ.** “Relation between the sarcolemmal Ca²⁺ current and Ca²⁺ sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling”. *Circ. Res.* 1996; **78**: 166-171.
 - * **Schneider MF, Chandler WK.** “Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling”. *Nature*. 1973; **242** (5395): 244-246.
 - * **Schofield G, Ikeda SR.** “Neuropeptide Y blocks a calcium current in C cells of bullfrog sympathetic ganglia”. *Eur. J. Pharmacol.* 1988; **151**: 131-134.
 - * **Schuerch L, Linder LM, Grouzmann E, Haefeli WE.** “Human neuropeptide Y potentiates α_1 -adrenergic blood pressure responses in vivo”. *Am. J. Physiol.* 1998; **275** (Heart Circ. Physiol. 44): H760-H766.
 - * **Scriven DRL, Dan P, Moore EDW.** “Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes”. *Biophys. J.* 2000; **79**: 2682-2691.
 - * **Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, Clark RB.** “Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway”. *Mol. Pharmacol.* 2000; **58** (5): 1162-1173.
 - * **Selbie LA, Hill SJ.** “G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways”. *TIPS*. 1998; **19**: 87-93.
 - * **Serone AP, Angus JA, Wright CE.** “Exogenous NPY modulation of cardiac autonomic reflexes and its pressor effect in the conscious rabbit”. *Br. J. Pharmacol.* 1998; **123**: 1375-1384.
 - * **Serone AP, Angus JA.** “Neuropeptide Y is a prejunctional inhibitor of vagal but not sympathetic inotropic responses in guinea-pig isolated left atria”. *Br. J. Pharmacol.* 1999; **127**: 383-390.
 - * **Sham JSK, Song L-S, Chen Y, Deng L-H, Stern MD, Lakatta EG, Cheng H.** “Termination of Ca²⁺ release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; **95**: 15096-15101.
 - * **Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM.** “Potentiation of fractional SR Ca²⁺ release by total and free intra-SR Ca²⁺ concentration”. *Biophys. J.* 2000; **78**: 334-343.
 - * **Sheikh SP.** “Neuropeptide Y and peptide YY: Major modulators of gastrointestinal blood flow and function”. *Am. J. Physiol.* 1991; **261**: G701-G715.
 - * **Sheriff S, Balasubramaniam A.** “Inhibitory and stimulatory effects of neuropeptide Y (17-36) on rat cardiac adenylate cyclase activity”. *J. Biol. Chem.* 1992; **267** (7): 4680-4685.
 - * **Shimoni Y, Severson D, Ewart HS.** “Insulin resistance and the modulation of rat cardiac K⁺ currents”. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; **279**: H639-H649.
 - * **Shimoni Y.** “Protein kinase C regulation of K⁺ currents in rat ventricular myocytes and its modification by hormonal status”. *J. Physiol.* 1999; **520** (2): 439-449.
 - * **Shine J, Potter EK, Biden T, Selbie L, Herzog H.** “Neuropeptide Y and regulation of the cardiovascular system”. *J. Hypertens.* 1994; **12** (Suppl 10): S41-S45.
-

-
- * **Sipido KR, Carmeliet E, Van de Werf F.** “T-type Ca^{2+} current as a trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig ventricular myocytes”. *J. Physiol.* 1998; **508**: 439-451.
 - * **Sipido KR, Maes M, van de Werf F.** “Low efficiency of Ca^{2+} entry through the Na^+ - Ca^{2+} exchanger as trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum- a comparison between L-type Ca^{2+} current and reverse mode Na^+ - Ca^{2+} exchange”. *Circ. Res.* 1997; **81**: 1034-1044.
 - * **Sitsapesan R, Williams AJ.** “Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel by luminal Ca^{2+} ”. *J. Membr. Biol.* 1994; **137**: 215-226.
 - * **Smith JS, Rousseau E, Meissner G.** “Calmodulin modulation of single sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channels from cardiac and skeletal muscle”. *Circ. Res.* 1989; **64**: 352-359.
 - * **Smith-White MA, Hardy TA, Brock JA, Potter EK.** “Effects of a selective neuropeptide Y Y_2 receptor antagonist, BIIE0246, on Y_2 receptors at peripheral neuroeffector junctions”. *Br. J. Pharmacol.* 2001; **134** (4): 861-868.
 - * **Smith-White MA, Herzog H, Potter EK.** “Role of neuropeptide Y Y_2 receptors in modulation of cardiac parasympathetic neurotransmission”. *Regul. Peptides.* 2002; **103**: 105-111.
 - * **Soares-Lemos V, Bucher B, Takeda K.** “Neuropeptide Y modulates ATP-induced increases in internal calcium via the adenylate cyclase/protein kinase A system in a human neuroblastoma cell line”. *Biochem. J.* 1997; **321**: 439-444.
 - * **Sreter JA.** “Temperature, pH and seasonal dependence of Ca-uptake and ATPase activity of white and red muscle microsomes”. *Arch. Biochem. Biophys* 1969. **134**: 25-33.
 - * **Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF.** “Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity”. *Peptides.* 1986; **7**: 1189-1192.
 - * **Stanley BG, Leibowitz SF.** “Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus”. *Life Sci.* 1984; **35**: 2635-2642.
 - * **Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A.** “The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product”. *Nature.* 1995; **377**: 530-532.
 - * **Stern MD.** “Teory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle”. *Biophys. J.* 1992; **63** (2): 497-517.
 - * **Suburo AM, Chiochio SR, Soler MV, Nieponice A, Tramezzani JH.** “Peptidergic innervation of blood vessels and interstitial cells in the testis of the cat”. *J. Androl.* 2002, **23** (1): 121-134.
 - * **Sun L, Philipson LH, Miller RJ.** “Regulation of K^+ and Ca^{2+} channels by a family of neuropeptide Y receptors”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998a; **284** (2): 625-632.
 - * **Sun LS, Rybin VO, Steinberg SF, Robinson RB.** “Characterization of the α_1 -adrenergic chronotropic response in neuropeptide Y-treated cardiomyocytes”. *Eur. J. Pharmacol.* 1998b; **349**: 377-381.

-
- * **Sun LS, Ursell PC, Robinson RB.** “Chronic exposure to neuropeptide Y determines cardiac α_1 -adrenergic responsiveness”. *Am. J. Physiol.* 1991; **261** (Heart Circ. Physiol. 30): H969-H973.
 - * **Swynghedauw B.** “Molecular mechanisms of myocardial remodeling”. *Physiol. Rev.* 1999; **79**: 215-262.
 - * **Tada M, Katz AM.** “Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma”. *Annu. Rev. Physiol.* 1982; **44**: 401-423.
 - * **Tajima Y, Ono K, Akaike N.** “Perforated patch-clamp recording in cardiac myocytes using cation-selective ionophore gramicidin”. *Am. Physiol. Soc.* 1996; **271** (2 pt 1): C524-C532.
 - * **Tatemoto K.** “Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine function”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982a; **79**: 2514-2518.
 - * **Tatemoto K.** “Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982b; **79**: 5485-5489.
 - * **Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V.** “Neuropeptide Y. A novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide”. *Nature.* 1982; **296**: 659-660.
 - * **Tatemoto K, Mutt V.** “Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides”. *Nature.* 1980; **285**: 417-418.
 - * **Thorsell A, Michalkiewicz M, Dumont Y, Quirion R, Caberlotto L, Rimondini R, Mathé AA, Heilig M.** “Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression”. *PNAS.* 2000; **97** (23): 12852-12857.
 - * **Tiaho F, Nargeot J, Richard S.** “Repriming of L-type calcium currents revealed during early whole-cell patch-clamp recordings in rat ventricular cells”. *J. Physiol.* 1993; **463**: 367-389.
 - * **Tohse N, Kameyama M, Irisawa H.** “Intracellular Ca^{2+} and protein kinase C modulate K^+ current in guinea pig heart cells”. *Am. J. Physiol.* 1987; **253** (22): H1321-H1324.
 - * **Tomaszuk A, Simpson C, Williams G.** “Neuropeptide Y, the hypothalamus and the regulation of energy homeostasis”. *Horm. Res.* 1996; **46**: 53-58.
 - * **Toth PT, Miller RJ.** “Calcium and sodium currents evoked by action potential waveforms in rat sympathetic neurones”. *J. Physiol.* 1995; **485** (1): 43-57.
 - * **Tseng GN, Hoffman BF.** “Two components of transient outward current in canine ventricular myocytes”. *Circ. Res.* 1989; **64**: 633-647.
 - * **Tsien R.** “Fluorescent probes of cell signalling”. *Ann. Rev. Neurosci.* 1989; **123**: 227-253.
 - * **Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GC, Lederer WJ.** “Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg^{2+} and phosphorylation”. *Science.* 1995; **267** (5206):1997-2000.
 - * **Valentijn JA, Vaudry H, Kloas W, Cazin L.** “Melanostatin (NPY) inhibited electrical activity in frog melanotrophs through modulation of K^+ , Na^+ and Ca^{2+} currents”. *J. Physiol.* 1994; **475** (2): 185-195.

-
- * **Vassort G.** “Adenosine 5'-triphosphate: a P2purinergic agonist in the myocardium”. *Physiol. Rev.* 2001; **81** (2): 767-806.
 - * **Vettor R, Zarjevski N, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B.** “Induction and reversibility of an obesity syndrome by intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats”. *Diabetology.* 1994; **37**: 1202-1208.
 - * **Vezzani A, Sperk G, Colmers WF.** “Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation”. *Trends Neurosci.* 1999; **22** (1): 25-30.
 - * **Voisin T, Goumain M, Lorinet A-M, Maoret J-J, Laburthe M.** “Functional and molecular properties of the human recombinant Y4 receptor: resistance to agonist-promoted desensitization”. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; **292** (2): 638-646.
 - * **Wahlestedt C, Hakanson R, Vaz CA, Zukowska-Grojec Z.** “Norepinephrine and neuropeptide Y: vasoconstrictor cooperation in vivo and in vitro”. *Am. J. Physiol.* 1990; **258**: R736-R742.
 - * **Wahlestedt C, Pich EM, Koob GF, Yee F, Heilig M.** “Modulation of anxiety and neuropeptide Y-Y1 receptors by antisense oligodeoxynucleotides”. *Science.* 1993; **259**: 528-531.
 - * **Wahlestedt C, Reis DJ.** “Neuropeptide Y-related peptides and their receptors-are the receptors potential therapeutic drug targets?”. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993; **32**: 309-352.
 - * **Wahlestedt C, Wohlfart B, Hakanson R.** “Effects of neuropeptide Y (NPY) on isolated guinea-pig heart”. *Acta Physiol Scand.* 1987; **129**: 459-463.
 - * **Wahlestedt C, Yanaihara N, Hakanson R.** “Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides”. *Regul. Pept.* 1986; **13**: 307-318.
 - * **Walsh KB.** “Activation of a heart chloride current during stimulation of protein kinase C”. *Mol. Pharmacol.* 1991, **40**: 342-346.
 - * **Wang J, Clofi P, Crowley WR.** “Neuropeptide Y suppresses prolactin secretion from rat anterior pituitary cells: evidence for interactions with dopamine through inhibitory coupling to calcium entry”. *Endocrinology.* 1996; **137** (2): 587-594.
 - * **Wang J-Z, Lundeberg T, Yu L-C.** “Antinociceptive effects induced by intra-periaqueductal grey administration of neuropeptide Y in rats”. *Brain Res.* 2000; **859**: 361-363.
 - * **Wang SQ, Song LS, Lakatta EG, Cheng H.** “Ca²⁺ signalling between single L-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in heart cells”. *Nature.* 2001b; **410**: 592-596.
 - * **Wang X, Day JR, Vasilatos-Younken R.** “The distribution of neuropeptide Y gene expression in the chicken brain”. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001a; **174**: 129-136.
 - * **Wang Z-L, Bennet WM, Wang R-M, Ghatei MA, Bloom SR.** “Evidence of a paracrine role of neuropeptide Y in the regulation of insulin release from pancreatic islets of normal and dexamethasone-treated rats”. *Endocrinology.* 1994; **135**: 200-206.
 - * **Wegener JW, Peiter A, Sampson SR, Nawrath H.** “Mechanism of block by 4-aminopyridine of the transient outward current in rat ventricular cardiomyocytes”. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1998; **32**: 134-138.
-

-
- * **Weinberg DH, Sirinatsinghji DJS, Tan CP, Shiao L-L, Morin N, Rigby MR, Heavens RH, Rapoport DR, Bayne MI, Cascieri MA, Strader CD, Linemeyer DL, McNeil DJ.** “Cloning and expression of a novel Neuropeptide Y receptor”. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 16485-16488.
 - * **Wettstein JG, Earley B, Junien JL.** “Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y”. *Pharmacol. Ther.* 1995; **65**: 397-414.
 - * **Wettwer E, Amos G, Posival H, Ravens U.** “Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin”. *Circ. Res.* 1994; **75**: 473-482.
 - * **Wetzel GT, Chen F, Klitzner TS.** “Calcium channel kinetics in acutely isolated fetal, neonatal, and adult rabbit cardiac myocytes”. *Circ. Res.* 1993; **72**: 1065-1074.
 - * **Wharton J, Gordon L, Byrne J, Herzog H, Selbie LA, Moore K, Sullivan MHF, Elder MG, Moscoso G, Taylor KM, Shine J, Polak JM.** “Expression of the human neuropeptide tyrosine Y₁ receptor”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993; **90**: 687-691.
 - * **Wickman KD, Iñiguez-Lluhl JA, Davenport PA, Taus-Sig R, Krapivinsky GB, Linder ME, Gilman AG, Clapham DE.** “Recombinant G-protein beta gamma-subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel”. *Nature.* 1994; **368**: 255-257.
 - * **Widdowson PS, Ordway GA, Halaris AE.** “Reduced neuropeptide Y concentrations in suicide brain”. *J. Neurochem.* 1992; **59**: 73-80.
 - * **Widerlöv E, Lindstrom LH, Wahlestedt C, Ekman R.** “Neuropeptide Y and peptide YY as possible cerebrospinal fluid markers for major depression and schizophrenia, respectively”. *J. Psych. Res.* 1988; **22** (1): 69-79.
 - * **Wieland HA, Engel W, Eberlein W, Rudolf K, Doods HN.** “Subtype selectivity of the novel nonpeptide neuropeptide Y Y₁ receptor antagonist BIBO 3304 and its effect on feeding in rodents”. *Br. J. Pharmacol.* 1998; **125**: 549-555.
 - * **Wieland HA, William KD, Entzeroth M, Wiene W, Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Doods HN.** “Subtype selectivity and antagonistic profile of the nonpeptide Y₁ receptor antagonist BIBP 3226”. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1995; **275** (1): 143-149.
 - * **Wier WG, Balke CW.** “Ca²⁺ release mechanisms, Ca²⁺ sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle”. *Circ. Res.* 1999; **85**: 770-776.
 - * **Wier WG, Egan TM, López-López JR, Balke CW.** “Local control of excitation-contraction coupling in rat heart cells”. *J. Physiol.* 1994; **474** (3): 463-471.
 - * **Wiley JW, Gross RA, Lu Y, McDonald RL.** “Neuropeptide Y reduces calcium current and inhibits acetylcholine release in nodose neurons via a pertussin toxin-sensitive mechanism”. *J. Neurophysiol.* 1990; **63** (6): 1499-1507.
 - * **Wiley JW, Gross RA, McDonald RL.** “Agonists for neuropeptide Y receptor subtypes NPY-1 and NPY-2 have opposite actions on rat nodose neuron calcium currents”. *J. Neurophysiol.* 1993; **70** (1): 324-330.
 - * **Williams G, Harrold JA, Cutler DJ.** “The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box”. *Prox. Nutr. Soc.* 2000; **59**: 385-396.
 - * **Woo ND, Ganguly PK.** “Neuropeptide Y prevents agonist-stimulated increases in contractility”. *Hypertension.* 1995; **26** (3): 480-484.
-

-
- * **Xiang H, Brown JC.** “Inhibitory effect of neuropeptide Y and its analogue on inositol 1,4,5-trisphosphate level in rat cardiomyocytes”. *Receptors Channels*. 1993; **1**: 315-321.
 - * **Xiong Z, Bolzon BJ, Cheung DW.** “Neuropeptide Y potentiates calcium-channel currents in single vascular smooth muscle cells”. *Pflügers Arch*. 1993; **423**: 504-510.
 - * **Xiong Z, Cheung DW.** “Neuropeptide Y inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells from the rat tail artery”. *Pflügers Arch*. 1994; **429**: 280-284.
 - * **Xu H, Guo W, Nerbonne JM.** “Four kinetically distinct depolarization activated K⁺ channel currents in mouse ventricular myocytes”. *J. Gen. Physiol*. 1999; **113**: 661-678.
 - * **Yang Z, Steele DS.** “Effects of cytosolic ATP on Ca²⁺ sparks and SR Ca²⁺ content in permeabilized cardiac myocytes”. *Circ. Res*. 2001; **89**: 526-533.
 - * **Yannielli PC, Harrington ME.** “Neuropeptide Y in the mammalian circadian system: effects on light-induced circadian responses”. *Peptides*. 2001; **22**: 547-556.
 - * **Yokosuka M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP.** “The mPVN mediates blockade of NPY-induced feeding by a Y₅ receptor antagonist: a c-FOS analysis”. *Peptides*. 2001; **22**: 507-514.
 - * **Zahradníková A, Zahradník I, Györke I, Györke S.** “Rapid activation of the cardiac ryanodine receptor by submillisecond calcium stimuli”. *J. Gen. Physiol*. 1999; **114**: 787-798.
 - * **Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR.** “Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane”. *J. Biol. Chem*. 1997a; **272**: 23389-23397.
 - * **Zhang S, Hiraoka M, Hirano Y.** “Effects of α_1 -adrenergic stimulation on L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes”. *J. Mol. Cell Cardiol*. 1998; **30**: 1955-1965.
 - * **Zhang X, Shi T, Holmberg K, Landry M, Huang W, Xiao H, Ju G, Hökfelt T.** “Expression and regulation of the neuropeptide Y Y₂ receptor in sensory and autonomic ganglia”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997b; **94**: 729-734.
 - * **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Baroni M, Leopold L, Friedman JM.** “Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue”. *Nature*. 1994; **372**: 425-432.
 - * **Zhou ZF, January CT.** “Both T-and L-type Ca²⁺ channels can contribute to excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje cells”. *Biophys. J*. 1998; **74**: 1830-1839.
 - * **Zhu G, Qu Z, Cui N, Jiang C.** “Suppression of Kir2.3 activity by protein kinase C phosphorylation of the channel protein at threonine 53*”. *J. Biol. Chem*. 1999; **274** (17): 11643-11646.
 - * **Zidichouski JA, Chen H, Smith PA.** “Neuropeptide Y activates inwardly rectifying K⁺ channels in C cells of amphibian sympathetic ganglia”. *Neurosci. Lett*. 1990; **117**: 123-128.
 - * **Zimmerman ANE; Hülsmann WC.** “Paradoxal influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart”. *Nature*. 1966; **211** (49): 646-647.
 - * **Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H.** “Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels”. *Nature*. 1999; **399**: 159-162.
-

- * **Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movajagh S, Ji H, Yeh Y, Chen W-T, Kleinman K, Grouzmann E. Grant DS.** “Neuropeptide Y. A novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium”. *Circ. Res.* 1998; **83**: 187-195.
- * **Zygmunt AC.** “Intracellular calcium activates a chloride current in canine ventricular myocytes”. *Am. J. Physiol.* 1994; **267**: H1984-1995.
- * **Zygmunt AC, Gibbons WR.** “Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes”. *Circ. Res.* 1991; **68**: 424-437.