



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 338 727**

② Número de solicitud: 200701919

⑤ Int. Cl.:  
**G01N 33/483** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **04.07.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2010**

Fecha de la concesión: **31.08.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **13.09.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**13.09.2011**

⑰ Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid  
c/ Einstein, nº 3  
28049 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Albillos Martínez, Almudena y  
Pérez Álvarez, Alberto**

⑳ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑳ Título: **Método para registrar variaciones en la capacidad de membrana generadas por variaciones en el potencial de membrana celular.**

㉑ Resumen:

Método para registrar variaciones en la capacidad de membrana generadas por variaciones en el potencial de membrana celular.

La presente invención se relaciona con un método para la caracterización de los mecanismos de secreción celular en respuesta a estímulos despolarizantes consistente en determinar la capacidad de membrana ( $C_m$ ) en modo de fijación de voltaje, cambiar rápidamente las células a modo de fijación de corriente y aplicar dicho estímulo y determinar la  $C_m$  de la célula en modo nuevamente de fijación de voltaje en donde la diferencia entre el valor final e inicial de  $C_m$  es una medida de la respuesta excitotónica de la célula.

ES 2 338 727 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Método para registrar variaciones en la capacidad de membrana generadas por variaciones en el potencial de membrana celular.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la electrofisiología y más concretamente, se relaciona con un método para registrar los eventos eléctricos y secretores que suceden en células excitables como las neuronas de una manera que refleje fielmente los acontecimientos que ocurren *in vivo*.

10 **Antecedentes de la invención**

El proceso de secreción regulada acoplada a estímulo es un proceso que implica la liberación de sustancias de los gránulos de almacenamiento intracelulares en respuesta a un estímulo despolarizante. El estímulo despolarizante provoca un aumento rápido en la concentración intracelular de calcio, lo que a su vez activa la maquinaria necesaria para la fusión de los gránulos de secreción con el interior de la membrana plasmática y la consiguiente liberación de su contenido al medio extracelular (García *et al.*, 2006; *Physiol Rev.* 2006; 86:1093-131, Sorensen, J. (*Trends Neurosci.* 2005 Sep; 28(9):453-455) y Sorensen, J. (*Pflugers Arch.* 2004 Jul; 448(4):347-62).

Tradicionalmente, el estudio de los procesos de secreción regulada se ha llevado a cabo mediante la detección por medio de técnicas de amperometría de la oxidación de las sustancias liberadas por las células excitadas (Wightman *et al.*, 1991, *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10754-10758). Sin embargo, una mayor resolución se consigue mediante la técnica de patch clamp (Hamill *et al.*, 1981, *Pflugers Arch* **391**, 85-100). Esta técnica permite registrar con alta resolución y fiabilidad la corriente iónica que fluye a través de la membrana celular y su potencial en una única célula. Esta técnica incrementó su desarrollo para poder registrar la capacidad de membrana ( $C_m$ ) (Neher, E. y Marty, A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, **79**, 6712-6716), que es una medida directa de la fusión de vesículas secretoras a la membrana celular y, por tanto, de la secreción.

Sin embargo, la técnica de patch-clamp está limitada porque no es posible medir simultáneamente el potencial de membrana y la corriente iónica, sino que es necesario fijar el potencial de membrana en el primer caso (modo "voltage clamp"), o la corriente en el segundo caso (modo "current clamp"). El modo de fijación de voltaje permite registrar la corriente que pasa a través de la membrana sin que se produzca una variación en el potencial de membrana que afectaría a la corriente, y ver la secreción asociada a ésta (Mollard *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3065-3069). Sin embargo, a la hora de estudiar una respuesta fisiológica, esto representa una limitación puesto que imposibilita la existencia de un potencial libre de membrana. En la respuesta fisiológica, el potencial juega un papel decisivo en la regulación de los procesos estimuladores a los que se ven sometidas las células excitables. El potencial de membrana es el responsable de la apertura, cierre y/o inactivación de canales iónicos dependientes de voltaje, los cuales regulan el trasiego de iones a través de la membrana plasmática, y además modula la fuerza electromotriz de este mencionado flujo. Por todo ello, hasta la fecha no ha sido posible monitorizar la fusión de vesículas a la membrana a través de variaciones en  $C_m$  cuando se produce un estímulo en el modo de fijación de corriente. Además, la actividad de los canales iónicos responsables de la corriente iónica y, por tanto, de la despolarización, depende en gran medida del potencial de membrana por lo que, en ausencia de despolarización, el comportamiento exocitótico de la célula no va a reflejar la respuesta fisiológica. En el caso particular de las células cromafines, un problema adicional resulta del hecho de que el aumento de calcio intracelular resulta de la apertura del canal iónico que forma parte del receptor de acetilcolina que es parcialmente permeable a calcio cuando se encuentra activado, pero también resulta de la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) que se activan solamente cuando la membrana se ha despolarizado. En las condiciones en las que se fija un voltaje constante similar al potencial de reposo, la membrana no está despolarizada y, por tanto, no se produce la apertura de los CCDV, por lo que sólo podremos medir la contribución a la respuesta exocitótica del calcio que ha entrado a través del receptor de acetilcolina y no a través de los CCDV.

Polo-Parada, L. *et al.* (*Neuroscience* 2006, 143:445-449) describen un método para evaluar la contribución de los distintos CCDV a la exocitosis de catecolaminas en células cromafines. Sin embargo, este método está basado en la variación del potencial de membrana (en el modo de fijación de voltaje) de células cromafines usando potenciales sinusoidales de distinta intensidad que no reflejan la situación fisiológica donde el potencial de membrana varía de forma continua, lo que modularía la entrada de calcio al citosol afectando a la corriente de entrada que fluye a través de canales dependientes de voltaje y por el receptor nicotínico.

Por tanto, existe una necesidad de métodos para el estudio de la respuesta exocitótica a un estímulo que reflejen más fielmente la situación fisiológica.

60 **Compendio de la invención**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para medir la respuesta exocitótica de una célula a un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- 65 a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor  $C_1$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula en estado basal

## ES 2 338 727 B1

- b. cambiar rápidamente las células a modo de fijación de corriente y aplicar dicho estímulo y
- c. cambiar las células de nuevo a modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_2$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula

5

en donde el valor de la diferencia entre los valores  $C_2$  y  $C_1$  es una medida de la respuesta exocitótica de la célula.

10 En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método para medir el efecto de la despolarización de membrana en una célula sobre la respuesta exocitótica de dicha célula a un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- 15 a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor  $C_1$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula en estado basal ( $C_1$ ),
- b. poner en contacto dicha célula con dicho estímulo y determinar en modo de fijación de voltaje un valor  $C_2$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estimulación
- 20 c. eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor  $C_3$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización,
- d. cambiar rápidamente a modo de fijación de corriente y aplicar de nuevo dicho estímulo y
- 25 e. cambiar rápidamente a modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_4$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula,

en donde un valor positivo de la diferencia  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  indica que al menos parte de la respuesta exocitótica de la célula al estímulo requiere de la despolarización de la membrana.

30

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de inhibidores o activadores de la secreción en respuesta a un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- 35 a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor  $C_1$  correspondiente a la  $C_m$  basal
- b. cambiar rápidamente a modo de modo de fijación de corriente y aplicar dicho estímulo en presencia del compuesto cuya actividad inhibidora se desea ensayar y
- 40 c. cambiar rápidamente a modo de modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_2$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula

en donde un valor de la diferencia entre  $C_2$  y  $C_1$  menor que el valor de dicha diferencia obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es inhibidor o activador de la secreción en respuesta al estímulo despolarizante y donde un valor de la diferencia entre  $C_2$  y  $C_1$  mayor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es activador de la secreción en respuesta al estímulo despolarizante.

45

50 En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de inhibidores o activadores de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana por un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- a. determinar en condiciones de voltaje constante un valor  $C_1$  correspondiente a la  $C_m$  basal de las células,
- 55 b. poner en contacto dicha células con dicho estímulo en modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_2$  correspondiente a la  $C_m$  de las células tras la estimulación,
- c. eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor  $C_3$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización, y
- 60 d. cambiar rápidamente a modo de modo de fijación de corriente y aplicar de nuevo dicho estímulo en presencia del compuesto cuya actividad inhibidora se desea ensayar y
- e. determinar a continuación en modo de fijación de voltaje un valor  $C_4$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula

65

en donde un valor de  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  menor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es inhibidor o activador de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana y donde valor de  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  mayor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es activador de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana.

## ES 2 338 727 B1

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de inhibidores o activadores de un canal de calcio dependiente de voltaje en una célula que contiene dicho canal de calcio dependiente de voltaje y al menos un receptor acoplado a un canal catiónico que comprende

- 5 a. determinar en condiciones de voltaje constante un valor  $C1$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula,
- b. poner en contacto dicha célula con un estímulo despolarizante en modo de fijación de voltaje,
- 10 c. determinar un valor  $C2$  correspondiente a la  $C_m$  de las células tras la estimulación,
- d. eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor  $C3$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización,
- 15 e. cambiar rápidamente a condiciones de corriente constante y añadir de nuevo dicho estímulo despolarizante en presencia del compuesto cuya actividad como inhibidor de los canales de calcio se desea ensayar hasta que el potencial de membrana sea el adecuado para la apertura del canal de calcio dependiente de voltaje y
- 20 f. cambiar rápidamente al modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C4$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula

en donde un valor de la diferencia  $(C4-C3)-(C2-C1)$  menor que el aumento observado en ausencia del compuesto indica que el compuesto inhibe o activa el canal de calcio dependiente de voltaje y donde un valor de la diferencia  $(C4-C3)-(C2-C1)$  mayor que el valor observado en ausencia del compuesto indica que el compuesto activa el canal de calcio dependiente de voltaje.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con un programa de ordenador que incluye medios codificados para llevar a cabo los pasos de los métodos de la invención.

En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con un medio legible por ordenador en el cual se almacenan medios codificados adaptados para llevar a cabo los pasos de los métodos de la invención.

En un octavo aspecto, la invención se relaciona con un sistema automatizado de microelectrodos para realizar estudios de patch-clamp que contiene el programa o el medio legible de la invención.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Corrientes nicotínicas y secreción producidas por la superfusión de ACh de células cromafines humanas. a) Corrientes nicotínicas y el correspondiente incremento  $C_m$  producido por 200 ms de superfusión con ACh 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  ó 1 mM. Las células se fijaron en voltaje a un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de -80 mV. La corriente nicotínica pico ( $I_{\text{ACh}}$ ) (b) y la carga ( $Q_{\text{ACh}}$ ) (c) se muestran frente a la concentración de ACh. Los puntos representan la media  $\pm$  E.E.M. del número de células mostrado entre paréntesis. d)  $C_m$  se determinó en el punto de tiempo correspondiente después de que la gran conductancia de membrana ( $G_m$ ) producida por ACh volviera al valor inicial.

Figura 2. Contribuciones del receptor nicotínico y los CSDV al acoplamiento estímulo-secreción en las células cromafines humanas. Se aplicaron pulsos de ACh 300  $\mu\text{M}$  de 200 ms de duración cada 5 min. a-c) Se muestran las diferentes fases del protocolo de tres etapas: a) Etapa 1. Se perfundió ACh sobre una células con fijación de voltaje a un  $V_h$  de -80 mV. La aplicación del agonista se indica por la flecha. Se midieron las corrientes iónicas y  $C_m$ . b) Etapa 2. Cambio al modo CC. Se aplicó el agonista un segundo después del cambio (véase la flecha). Se monitorizó el potencial de membrana ( $V_m$ ). El tiempo total empleado en el modo CC fue de 4 s. c) Etapa 3. Cambio al modo VC. Se registró  $C_m$ . d) Trazados originales obtenidas en una célula cromafín humana tras ejecutar cada etapa del protocolo anterior. La interrupción en los trazados de  $C_m$  y  $V_m$  (etapa 1 y 2) indica que sólo se muestran la parte inicial y final de los registros. e) Las etapas 1 (izquierda) y 2 (derecha) del protocolo se realizaron en condiciones de control (trazado negro) y tras superfusión con mecamilamina 10  $\mu\text{M}$  durante 5 min. Antes de que se administrara ACh (trazado gris). Se perfundió conjuntamente el antagonista con el agonista durante el estímulo. f) Curvas de despolarización (etapa 2) en condiciones de control (trazado negro) y tras superfusión con TTX 2  $\mu\text{M}$  durante 1 min. antes del pulso de ACh (trazado gris).

Figura 3. Papel de la corriente nicotínica en el acoplamiento estímulo-secreción en células cromafines. a) Ampliación de la parte inicial de los trazados originales superpuestas de la corriente nicotínica (línea gris, de la etapa 1 del protocolo,  $V_h = -80$  mV) y la despolarización de la membrana plasmática (línea negra, etapa 2 del protocolo) producida por pulsos de 200 ms de ACh 300  $\mu\text{M}$  en la misma célula. b) Trazados originales de la corriente nicotínica (etapa 1 del protocolo,  $V_h = -80$  mV) y la despolarización de la membrana plasmática (etapa 2) provocada por pulsos de 15 s de ACh 300  $\mu\text{M}$ . c) Correlación entre la duración de la corriente nicotínica (de la etapa 1) y la duración de la despolarización de la membrana (de la etapa 2) obtenida con pulsos de 200 ms de ACh 300  $\mu\text{M}$  (n=19). d) Corrientes nicotínicas registradas en una célula con fijación de voltaje ( $V_h = -80$  mV) en condiciones de control (línea negra) y

tras la cancelación del bloqueo con mecamilamina 10  $\mu\text{M}$  (línea gris). Estímulo: pulsos de 200 ms de ACh 300  $\mu\text{M}$ . e) Despolarizaciones provocadas por ACh en condiciones de control (línea negra), y tras la cancelación del bloqueo de mecamilamina 10  $\mu\text{M}$  (línea gris). f) Correlación entre la carga de corriente nicotínica (de la etapa 1) y la duración de la despolarización de la membrana (de la etapa 2) obtenida a partir de los mismos registros que en c.

5  
10  
15  
Figura 4. Contribuciones de los CCDV al acoplamiento estímulo-secreción en células cromafines humanas. a) Secreción normalizada ( $\Delta C_m$ ) obtenida en las etapas 1 y 3. La secreción obtenida en la etapa 1 se consideró como la unidad. Los datos representan la media  $\pm$  E.E.M. del número de células mostrado entre paréntesis (\*\*\*p<0,001). b-d) Se realizó el protocolo completo en primer lugar en condiciones de control (1), después tras la perfusión durante 1 min. con CdCl<sub>2</sub> 200  $\mu\text{M}$  (2, trazados grises), y finalmente en condiciones de cancelación (3). Se muestran trazados originales de las corrientes iónicas y  $C_m$  (etapa 1),  $V_m$  (etapa 2) y  $C_m$  (etapa 3) en las secciones a, b y c de la figura, respectivamente. Estímulo: pulsos de 200 ms de ACh 300  $\mu\text{M}$  aplicados cada 5 min. e-f) Despolarizaciones de membrana producidas por pulsos de 15 s de ACh 300  $\mu\text{M}$  aplicados cada 5 min., en condiciones de control (e), y tras la perfusión durante 1 min. con CdCl<sub>2</sub> 200  $\mu\text{M}$  (f).

### Descripción detallada de la invención

15  
20  
25  
30  
La presente invención se basa en el descubrimiento por parte de los autores de la invención de que la medida de la secreción celular en respuesta a un estímulo puede realizarse mediante una primera etapa en la que registra brevemente la capacidad basal de la membrana celular (en modo de fijación de voltaje), una segunda etapa en la que la célula se estimula en condiciones de corriente constante para luego, en una tercera etapa, pasar de nuevo rápidamente a condiciones de voltaje constante para así determinar cambios en la capacidad de la membrana respecto al estado previo (medido en la primera etapa) como medida de la respuesta secretora. En estas condiciones, la diferencia entre los valores de capacidad determinada en la tercera etapa y la capacidad basal proporciona una medida de la respuesta secretora de la célula que refleja más fielmente las condiciones fisiológicas que los métodos conocidos en el estado de la técnica, puesto que el estímulo se aplica en condiciones que permiten la despolarización de la membrana. Además, la estimulación puede realizarse empleando el neurotransmisor fisiológico durante periodos ultracortos (milisegundos) lo que ayuda a remedar la situación fisiológica. Es por ello que usando el método de la invención, es posible determinar la respuesta secretora de una célula en condiciones más próximas a las fisiológicas que los métodos conocidos en el estado de la técnica y sin que se produzca la pérdida de la sincronía estímulo-respuesta.

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un método para medir la respuesta excitotóxica de una célula a un estímulo despolarizante (de aquí en adelante método A) que comprende las etapas de

- 35  
40
- a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor C1 correspondiente a la  $C_m$  de la célula en estado basal
  - b. cambiar rápidamente las células a modo de fijación de corriente y aplicar dicho estímulo y
  - c. cambiar las células de nuevo a modo de fijación de voltaje y determinar un valor C2 correspondiente a la  $C_m$  de la célula

en donde el valor de la diferencia entre los valores C2 y C1 es una medida de la respuesta excitotóxica de la célula.

45  
50  
55  
Los inventores han puesto también de manifiesto que usando el protocolo antes descrito es posible distinguir la respuesta excitotóxica que se produce a consecuencia de la entrada de calcio a través de los CCDV (que requiere de la despolarización de membrana para su apertura) de la respuesta que se produce a consecuencia de la entrada de calcio por canales que se abren en respuesta al estímulo despolarizante aplicado en el modo de fijación de voltaje (y que, por tanto, no producen la despolarización de membrana), es decir, que es posible determinar la respuesta excitotóxica de una célula a un estímulo que produzca secreción en condiciones de voltaje constante y que, por su efecto despolarizante, también lo produzca en condiciones de corriente constante. Para ello es necesario efectuar una medida de la  $C_m$  en condiciones de voltaje constante tras haber mantenido la célula en presencia del estímulo durante un tiempo determinado para después aplicar de nuevo el estímulo en modo de fijación de corriente y, por último, determinar de nuevo la capacidad en condiciones de voltaje constante, de forma que se obtiene un valor de aumento de  $C_m$  en la célula que permite determinar la respuesta secretora en respuesta a la despolarización mediante la comparación del valor de capacidad final con el valor de capacidad obtenido en la primera etapa.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para medir el efecto de la despolarización de membrana en una célula sobre la respuesta excitotóxica de dicha célula a un estímulo despolarizante (de aquí en adelante método B) que comprende las etapas de

- 60  
65
- a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor C1 correspondiente a la  $C_m$  de la célula en estado basal (C1),
  - b. poner en contacto dicha célula con dicho estímulo y determinar en modo de fijación de voltaje un valor C2 correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estimulación
  - c. eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor C3 correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización,

## ES 2 338 727 B1

- d. cambiar rápidamente a modo de fijación de corriente y aplicar de nuevo dicho estímulo y
- e. cambiar rápidamente a modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_4$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula,

5

en donde un valor positivo de la diferencia  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  indica que al menos parte de la respuesta excitotónica de la célula al estímulo requiere de la despolarización de la membrana.

Según se entiende en la presente invención, un estímulo despolarizante es aquel que produce una despolarización de la membrana cuando se aplica en condiciones fisiológicas. Es obvio para el experto en la materia que un estímulo despolarizante que se aplica en condiciones de fijación de voltaje no puede provocar una despolarización de membrana, puesto que el voltaje se encuentra fijado externamente por el método de medida. En esos casos, por estímulo despolarizante se entiende toda aquella señal (en general un compuesto químico) que sea capaz de provocar un trasiego iónico cuando se aplica en condiciones de voltaje constante o bien una despolarización de la membrana cuando se aplica en condiciones de fijación de corriente.

Los valores de potencial de membrana que se aplican en las etapas (a) y (c) de fijación de voltaje, así como los valores de corriente que se aplican en la etapa (b) de fijación de corriente en el método A, así como los valores de potencial de membrana que se aplican en las etapas (a) a (c) y (e) de fijación de voltaje y los valores de corriente que se aplican en la etapa (d) de fijación de corriente en el método B son los valores usuales en la técnica para las medidas electrofisiológicas. Así, en las etapas de fijación de voltaje, el voltaje que se aplica corresponde al potencial de reposo de la célula que se desea estudiar. Preferentemente, el voltaje se fija a un valor de en torno a -80 mV. El valor de la corriente que se aplica en las etapas de fijación de corriente es de en torno a -5 pA.

El estímulo despolarizante puede ser un mensajero químico que se une a un receptor en la superficie de la célula provocando la apertura de un canal iónico que permite la entrada de un ion y la consiguiente despolarización de la membrana o puede ser un potencial de acción que permite que una despolarización localizada en una zona de la membrana se propague a regiones adyacentes de dicha membrana y, eventualmente, a toda la membrana plasmática de la célula, mediante la apertura de canales de sodio dependientes de voltaje en respuesta a dicha despolarización inicial. El potencial de acción se genera habitualmente como consecuencia de la apertura de un canal iónico en la membrana en respuesta a un neurotransmisor, aunque puede originarse también por acoplamiento con un potencial de acción producido en una célula vecina tal y como se ha descrito por Moser, T. (*J. Physiol.* 1998, 506:195-205). En una forma de realización preferida, el estímulo despolarizante es un mensajero químico. La invención contempla el uso de cualquier compuesto conocido para el que existan receptores en la superficie de la membrana y cuya ocupación resulte en una despolarización de la membrana.

La transición entre las etapas (a) y (b) y/o entre las etapas (b) y (c) en el método A y entre las etapas (c) y (d) y/o entre las etapas (d) y (e) en el método B debe ser lo suficientemente rápida para que no se produzca la pérdida de la sincronía estímulo-secreción. Así, en una forma de realización preferida, la transición entre modos debe transcurrir en el orden de milisegundos. Así mismo, en otra forma de realización preferida, la transición entre el modo de fijación de corriente al modo de fijación de voltaje en la etapa (b) debe transcurrir en el orden de milisegundos. Un periodo del "orden de milisegundos", tal como se usa aquí, debe interpretarse como un periodo que oscila entre 1 y 900 ms, preferiblemente entre 100 y 800 ms, más preferiblemente entre 200 y 700 ms, aún más preferiblemente entre 300 y 600 ms y, aún más preferiblemente, entre 400 y 500 ms. Valores ejemplares, no limitantes para la transición entre las etapas de voltaje constante y corriente constante son 400 ms, 200 ms y 50 ms.

Con el fin de simular las condiciones fisiológicas, la aplicación del ligando se realiza de forma que simule la estimulación neuronal por neurotransmisores en el espacio sináptico. Así, en una forma de realización, la aplicación del estímulo se realiza de manera ultracorta, preferiblemente del orden de milisegundos, y/o repetitiva, preferiblemente con una frecuencia de 0.1 a 100 Hertzios.

La medida de la capacidad de membrana requiere la aplicación de una onda sinusoidal de voltaje sobre el potencial de -80 mV. Esta onda tiene típicamente una amplitud de en torno a 70 mV (de +115 mV a +45 mV) y mide la capacidad de la membrana a una frecuencia de en torno a 1 KHz.

55

La presente invención permite el estudio de la respuesta secretora de prácticamente cualquier tipo de célula capaz de secretar al medio mediante exocitosis una determinada molécula en respuesta a un estímulo despolarizante. Así, en formas preferidas de realización, el método de la invención se puede aplicar al estudio de la respuesta excitotónica en células cromafines, PC12 (secretan catecolaminas en respuesta a la activación de receptores nicotínicos por acetilcolina), células  $\beta$  pancreáticas (secretan insulina en respuesta a la estimulación por glucosa a través de la inhibición de los canales  $K_{ATP}$  que provocan la despolarización de la membrana) (Dean, P.M. *et al.*, *J Physiol.* 1975 Mar; 246(2):459-78), neuronas del hipocampo (secretan BDNF y otras neurotrofinas en respuesta a la activación de receptores NMDA por glutamato) (Staiger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002 Apr 30; 99:6386-91), linfocitos (secretan inmunoglobulinas en respuesta a la activación del canal de sodio epitelial), (*Am J Physiol Cell Physiol.*, 2002 Nov; 283:C1480-91) neutrófilos (secretan compuestos microbicidas y proinflamatorios en respuesta a una variedad de agonistas) (Simchowicz L, *et al. J Clin Invest.* 1980 Oct; 66(4):736-47), neuronas de los ganglios raíz dorsales (secretan péptidos relacionados con la señalización del dolor en respuesta a una despolarización de membrana) (Zhang, C. y Zhou, Z., *Nat. Neurosci.* 2002 May; 5(5):425-30) y otras células similares como las motoneuronas.

## ES 2 338 727 B1

En una forma preferida de la invención, las células objeto de estudio son células cromafines. En este tipo de células, el proceso de secreción comienza por la estimulación de receptores nicotínicos situados en la membrana de la célula por acetilcolina liberada por las neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático. La estimulación de los receptores nicotínicos resulta en la apertura de canales catiónicos no específicos y en la entrada de una corriente de cationes que provoca una despolarización de la membrana. Esta despolarización ocasiona la apertura de CCDV que se encuentran en la membrana y que permiten la entrada de calcio en la célula. Así mismo, la acetilcolina liberada por las fibras preganglionares es capaz de estimular receptores muscarínicos que también se encuentran presentes en las células cromafines. Dicha estimulación resulta en la liberación de calcio de sus almacenamientos intracelulares. La liberación de catecolaminas de los gránulos secretores se produce en respuesta a un aumento en la concentración intracelular de calcio. Así, el aumento en la concentración intracelular de calcio y, por tanto, la respuesta secretora resulta de tres procesos que son: la entrada de calcio a través del receptor de acetilcolina, la entrada de calcio a través de los CCDV y la liberación de calcio de sus almacenamientos intracelulares.

En una forma aún más preferida de la invención, las células cuya respuesta secretora se desea estudiar son células cromafines y el ligando que se usa para estimular la secreción es acetilcolina o uno o varios agonistas nicotínicos. Agonistas nicotínicos que pueden ser utilizados en el método objeto de la invención incluyen, sin estar limitados, dimetilfenilpiperazinio (DMPP), anabasina, decamethonio, cloruro de suxametonio, nicotina, meta-nicotina, DMAC, 3-2,4-dimetoxibenzilidina anabaseina (DMBX-anabaseina), colina, citisina, GTS-21, epibatidina, ABT-418, ABT-594, SIB-1508 y SIB-1558.

En otra forma preferida de realización, la aplicación del ligando a la célula se realiza de manera ultracorta (del orden de milisegundos) y repetitiva (de 0.1 a 100 Hertzios), simulando la descarga de neurotransmisores por parte de una neurona.

En otra forma de realización, la etapa inicial de determinación de la  $C_m$  basal en el método B de la invención se puede llevar a cabo en presencia de un antagonista del receptor. En el caso de que el receptor es un receptor nicotínico, los antagonistas incluyen tanto antagonistas competitivos que se unen al receptor de acetilcolina en el sitio de unión de la acetilcolina como antagonistas no competitivos, que se unen al receptor a sitios distintos del sitio de unión del agonista. Así mismo, los antagonistas nicotínicos que pueden ser objeto de la invención incluyen antagonistas reversibles o irreversibles. Así, antagonistas nicotínicos útiles para la realización de la invención incluyen, sin ser limitante, toxinas bloqueantes de distintas subunidades del receptor nicotínico como la bungarotoxina  $\alpha$ , la toxina RgIA, OmIA,  $\alpha$ -conotoxina ArIB u otras sustancias como hexametonio, decametonio, dihidro- $\beta$ -erytroidina, mecamilamina, galamina, d-tubocurarina, trimetapan, amantadine, erisodina, pempidina, clorisondamina, normecamilamina, 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, 2,2,6,6-tetrametil-4-aminopiperidina, metillicaconitina, N-(1,2,2) trimetyl-1-biciclo [2,2,1]-heptilbencenamina, esteres metílicos del ácido feniltropano carboxílico y ibogaina.

En una forma preferida de la invención, la etapa inicial del método B de la invención se lleva a cabo usando una célula cromafín y usando acetilcolina como ligando y en presencia de un antagonista nicotínico.

En otra forma de realización preferida, los métodos A y B de acuerdo a la invención se pueden llevar a cabo en presencia de un potenciador/activador de los receptores de acetilcolina, como, por ejemplo, 5-hidroxiindol, galantamina o ivermectina.

En otra forma preferida de la invención, en el cambio de modo de fijación de voltaje a fijación de corriente, se puede aplicar una mínima corriente idéntica a la que el amplificador emplea para mantener el potencial en el modo de fijación de voltaje, puesto que si esta no se aplicase, el propio cambio de modo sería un estímulo que enmascararía la respuesta a estudiar.

En otra forma de realización, la determinación de la contribución de la despolarización de la membrana a la  $C_m$  en respuesta a estímulo, según el método B de la invención, se lleva a cabo en presencia de un antagonista de canales de calcio, lo que permite determinar, mediante comparación con el método realizado en ausencia de antagonista, como contribuyen a la secreción (i) la aplicación de estímulo (que induce la apertura del receptor nicotínico y la entrada de cationes al citosol) realizada en la primera etapa, y (ii) los canales de calcio en la segunda etapa cuál (que en esta configuración se activan debido a la despolarización inducida por la apertura del receptor nicotínico).

En otra forma de realización preferida, la célula secretora es una célula cromafín, el ligando es acetilcolina y el antagonista es un inhibidor de los CCDV. Por antagonistas del calcio, tal como se define aquí, se entiende cualquier molécula que es capaz de impedir la apertura del canal disminuyendo así su conductancia. Se incluyen en este grupo las fenilalquilaminas como el verapamilo y gallopamilo, benzotiazepinas como el diltiazem, y dihidropiridinas como el amlodipino, felodipino, isradipino, lacidipino, nicardipino, nifedipino, nitrendipino y nisoldipino.

En otra forma de realización preferida, la célula cuya actividad secretora se desea estudiar posee al menos un CCDV. Preferentemente, el CCDV se selecciona del grupo de un canal tipo L, un canal tipo N, un canal tipo P/Q, un canal tipo T y un canal tipo R.

En otra forma de realización, los métodos A y B de la invención se llevan a cabo en una célula que se ha tratado previamente con al menos un compuesto que causa la eliminación de las reservas intracelulares de calcio. Compuestos que pueden ser utilizados con este propósito en el ámbito de la invención incluyen agonistas del receptor de rianodina como cADPr, 4-cloro-m-cresol, suramina, cafeína y pentifilina, compuestos que mantienen el receptor de rianodina

## ES 2 338 727 B1

en estado de semiconductividad como rianodina y compuestos que bloquean la recaptación de calcio por el retículo endoplásmico, como por ejemplo la tapsigargina.

5 En otra forma de realización preferida, el método de la invención se puede llevar a cabo en presencia de un de un potenciador/activador de los canales de calcio, como por ejemplo, Bay K 8644 y glicerotoxina.

10 El método desarrollado por los inventores permite estudiar en condiciones próximas a las fisiológicas la respuesta secretora de una célula en respuesta a un estímulo despolarizante y, consecuentemente, es de utilidad para el desarrollo de métodos para la identificación de compuestos que inhiban o activen dicho proceso. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de inhibidores o activadores de la secreción en respuesta a un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor  $C1$  correspondiente a la  $C_m$  basal
- 15 b. cambiar rápidamente las células a modo de modo de fijación de corriente y aplicar dicho estímulo en presencia del compuesto cuya actividad inhibidora se desea ensayar y
- c. determinar a continuación en modo de fijación de voltaje un valor  $C2$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula

20 en donde un valor de la diferencia entre  $C2$  y  $C1$  menor que el valor de dicha diferencia obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es inhibidor de la secreción en respuesta al estímulo despolarizante y donde un valor de la diferencia entre  $C2$  y  $C1$  mayor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es activador de la secreción en respuesta al estímulo despolarizante.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de inhibidores o activadores de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana por un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- 30 a. determinar en condiciones de voltaje constante un valor  $C1$  correspondiente a la  $C_m$  basal de las células,
- b. poner en contacto dicha células con dicho estímulo en modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C2$  correspondiente a la  $C_m$  de las células tras la estimulación,
- 35 c. eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor  $C3$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización, y
- d. cambiar rápidamente a modo de modo de fijación de corriente y aplicar de nuevo dicho estímulo en presencia del compuesto cuya actividad inhibidora o activadora se desea ensayar y
- 40 e. determinar a continuación en modo de fijación de voltaje un valor  $C4$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula

45 en donde un valor de  $(C4-C3)-(C2-C1)$  menor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es inhibidor de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana y donde valor de  $(C4-C3)-(C2-C1)$  mayor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es activador de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana.

50 Además, la aplicación en la etapa a del estímulo permite determinar cuál es el porcentaje de contribución a la secreción total (con despolarización de la membrana.) del estímulo en ausencia de los elementos activados por voltaje (los CCDV).

55 Los métodos de identificación de inhibidores y activadores de la secreción/despolarización en respuesta a un estímulo despolarizante de acuerdo a la presente invención permiten la identificación de compuestos de interés farmacológico. Así, inhibidores de la secreción de catecolaminas en respuesta a la estimulación de células cromafines por acetilcolina pueden ser de utilidad para el tratamiento de condiciones en las que existe una secreción aumentada de catecolaminas (por ejemplo, estrés, hipertensión, feocromocitoma). También podrían ser útiles en la inhibición de la excitabilidad celular en situaciones donde esta se encuentra aumentada como consecuencia de una activación neuronal masiva y repetitiva, como se da en la isquemia cerebral donde se libera gran cantidad de glutamato, y en la epilepsia. Además, en la esquizofrenia se postula la existencia de una actividad dopaminérgica elevada y, por lo tanto, un inhibidor específico de la secreción sería útil para el tratamiento de este trastorno neurológico. Alternativamente, activadores de la secreción de insulina en respuesta a glucosa pueden ser de utilidad para el tratamiento de enfermedades relacionadas con una baja producción de insulina por las células B del páncreas como la diabetes. En el caso de la enfermedad de Alzheimer y en la de Parkinson los activadores de la secreción actuarían sobre neuronas colinérgicas implicadas en la formación y mantenimiento de la memoria, y sobre las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, respectivamente, pudiendo mejorar sus respectivos síntomas. En la miastenia gravis, se incrementaría la liberación de acetilcolina a la sinapsis muscular para contrarrestar los signos y síntomas de la enfermedad.

## ES 2 338 727 B1

El método desarrollado por los autores de la presente invención permite captar registros de capacidad de alta resolución de la respuesta exocitótica de la célula completa provocada por ACh, el neurotransmisor fisiológico estímulo despolarizante en la sinapsis de los nervios espláncnicos-células cromafines y en la sinapsis de los nervios simpáticos. En estas células se produce una primera entrada de calcio a consecuencia de la activación del receptor por el agonista del receptor acoplado a canal iónico, y una segunda entrada de calcio por los CCDV al abrirse como consecuencia de la despolarización. En los métodos conocidos hasta la fecha para la determinación de respuesta secretora basados en medidas de capacidad en condiciones de voltaje constante, no se producía despolarización de la membrana como consecuencia de la aplicación del agonista en fijación de voltaje, con lo que el segundo componente de entrada de calcio no se tenía lugar, por lo que era imposible determinar la contribución a la exocitosis por la entrada de calcio a través de los CCDV. Dado que el método descrito en la presente invención permite determinar la exocitosis asociada específicamente a la apertura de los CCDV, se puede utilizar para la identificación de inhibidores y activadores de los CCDV. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de inhibidores o activadores de un canal de calcio dependiente de voltaje en una célula que contiene dicho canal de calcio dependiente de voltaje y al menos un receptor acoplado a un canal catiónico que comprende

- a. determinar en condiciones de voltaje constante un valor C1 correspondiente a la  $C_m$  de la célula,
- b. poner en contacto dicha célula con un estímulo despolarizante en modo de fijación de voltaje,
- c. determinar un valor C2 correspondiente a la  $C_m$  de las células tras la estimulación,
- d. eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor C3 correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización,
- e. cambiar rápidamente a condiciones de corriente constante y añadir de nuevo dicho estímulo despolarizante en presencia del compuesto cuya actividad como inhibidor de los canales de calcio se desea ensayar hasta que el potencial de membrana sea el adecuado para la apertura del canal de calcio dependiente de voltaje y
- f. cambiar rápidamente al modo de fijación de voltaje y determinar un valor C4 correspondiente a la  $C_m$  de la célula

en donde un valor de la diferencia  $(C4-C3)-(C2-C1)$  menor que el aumento observado en ausencia del compuesto indica que el compuesto inhibe el canal de calcio dependiente de voltaje y donde un valor de la diferencia  $(C4-C3)-(C2-C1)$  mayor que el valor observado en ausencia del compuesto indica que el compuesto activa el canal de calcio dependiente de voltaje.

Además, con este método se puede conocer el efecto que el compuesto pueda tener sobre la respuesta al estímulo aplicado en la etapa a (ej: la secreción producida por la apertura de un receptor acoplado a un canal iónico como el receptor de acetilcolina y la propia corriente así generada), que sería responsable de la despolarización en la etapa b. Esto permite discernir si esa inhibición/potenciación es dependiente de la despolarización de membrana o por el contrario se debe a un efecto sobre el estímulo aplicado en condiciones de voltaje constante.

En una forma de realización preferida, la célula que se estudia en el método de la invención es una célula cromafín. En otra forma de realización de la invención, el estímulo despolarizante es acetilcolina o un agonista colinérgico.

Los métodos de identificación de inhibidores y activadores de CCDV permiten la identificación de compuestos de interés farmacológico. Así, inhibidores de dichos canales pueden ser de utilidad para la prevención de muerte neuronal tras un episodio de ictus, la prevención y el tratamiento del infarto de miocardio, la hipertensión, la epilepsia y la esquizofrenia. Activadores de dichos canales pueden ser de utilidad para el tratamiento de patologías tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la miastenia gravis y el déficit de atención/hiperactividad.

Los distintos métodos descritos anteriormente pueden llevarse a cabo usando un sistema automatizado en el que las distintas etapas del método están implementadas en un programa de ordenador que contiene medios codificados para llevar a cabo los métodos de la invención. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un programa de ordenador que incluye medios codificados para llevar a cabo los pasos de los métodos de la invención.

El programa de ordenador se aporta sobre un medio legible por ordenador. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un medio legible por ordenador en el cual se almacenan medios codificados adaptados para llevar a cabo los pasos de los métodos según la invención. Cualquier método o tecnología para almacenar la información es válida para almacenar el programa objeto de la invención. Ejemplos de medios de información legibles por un ordenador incluyen RAM, ROM, EEPROM, memoria flash u otros tipos de memoria, CD-ROM, DVD u otros tipos de almacenamiento de tipo óptico, cassetes magnéticos, cintas magnéticas, discos u otros tipos de dispositivos para el almacenamiento magnético. Alternativamente, el programa se puede albergar en un dispositivo de almacenamiento remoto y las instrucciones son enviadas mediante un sistema de comunicación telemático tales como un interfaz inalámbrico, Internet, redes de área local, redes de área ancha, conexiones directas a través de un puerto de serie (USB) o mediante modem, redes digitales de servicios integrados (RDSI), digital subscriber lines (DSLs), enlaces vía satélite y otros tipos de comunicaciones conocidas para el experto en la materia.

## ES 2 338 727 B1

El método de la invención se lleva a cabo preferentemente usando un sistema automatizado de microelectrodos que permita programar con antelación los parámetros empleados en cada una de las distintas etapas de corriente o voltaje constante así como las condiciones en las que se efectúa la transición de un modo a otro. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un sistema automatizado de microelectrodos para realizar estudios de patch-clamp que contiene el programa de la invención o el medio legible de la invención. En una forma de realización preferida, el sistema automatizado de microelectrodos es un amplificador de patch-clamp.

La invención se describe a continuación mediante una serie de ejemplos que no son limitativos de la invención, sino ilustrativos.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### 15 *Cultivo celular*

Este estudio se realizó en células cromafines humanas obtenidas mediante la donación de glándulas adrenales para fines de investigación y tras ser aprobado por los comités éticos pertinentes. Todos los donantes habían fallecido debido a hemorragia cerebral. Una vez obtenido el consentimiento informado por escrito de los parientes de los donantes, se recogieron las glándulas suprarrenales en disolución tampón de Locke fría (LBS, "Locke's buffer solution") y se procesaron inmediatamente. En primer lugar, se eliminó rápidamente el tejido adiposo. Las glándulas se perfundieron de manera retrógrada con una proteasa de tipo XIV al 1% disuelta en LBS, y se transfirieron a un tubo de 50 ml que contenía LBS a 37°C durante 10 min. Después se cortaron las glándulas de manera sagital y se eliminó la médula mecánicamente con un bisturí, se cortaron en piezas, y se pusieron en una disolución de colagenasa tipo I (1 mg/ml) a 37°C durante 30 min. Se agitó suavemente la suspensión cada 5-10 min. para permitir la desagregación del tejido. Tras este periodo, se filtró la suspensión a través de una malla de nylon de 200  $\mu\text{m}$  y se centrifugó a 170 g durante 10 min. Entonces se resuspendió el sedimento en LBS y se centrifugó de nuevo a 40 g durante 10 min. Se resuspendió de nuevo el sedimento obtenido en LBS y se filtró a través de una malla de de nylon de 80  $\mu\text{m}$ . Se añadió un 4% de albúmina bovina al fondo del tubo de 50 ml, y se centrifugó de nuevo la suspensión. Finalmente, se realizó la última centrifugación en DMEM (Gibco, España) complementado con suero de ternero fetal al 5%, penicilina 50 U.I./ml, y estreptomicina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se cultivaron en placa las células sobre portaobjetos tratados con polilisina de 12 mm, y se mantuvieron durante hasta 10 días en una incubadora a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% saturada de agua.

#### 35 Ejemplo 2

##### *Registros electrofisiológicos*

Para los registros de célula completa en pequeñas extensiones perforadas, la disolución externa fue (en mM):  $\text{CaCl}_2$  2, NaCl 145, KCl 5,6,  $\text{NaHCO}_3$  3,6, HEPES 5 y glucosa 10. Se ajustó el pH hasta 7,4 con NaOH. La composición de la disolución intracelular fue: glutamato de K 145, NaCl 8,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10 y anfotericina B 0,5 (Sigma-Aldrich, España) y se ajustó el pH hasta 7,2 con KOH. Se preparó cada día una disolución madre de anfotericina B a una concentración de 50 mg/ml en dimetilsulfóxido (DMSO) y se mantuvo protegida de la luz. Se preparó la concentración final de anfotericina B mediante ultrasonificación de 10  $\mu\text{l}$  de disolución madre de anfotericina B en 1 ml de disolución interna de glutamato de K en la oscuridad. Las pipetas se sumergieron por la punta en disolución libre de anfotericina durante varios segundos y se rellenaron después con disolución de anfotericina intracelular mezclada recientemente.

El sistema de perfusión para la aplicación de fármacos consistió en una pipeta de polietileno de múltiples vías situada cerca de la célula en estudio que permitió el intercambio completo de las disoluciones cerca de la célula en un plazo de 50 ms.

Se llevaron a cabo las mediciones electrofisiológicas usando un amplificador EPC-10 y software PULSE (HEKA Elektronik, Alemania) ejecutándose en un ordenador personal. Se fabricaron pipetas de resistencia de 2-3 M $\Omega$  con tubos capilares de vidrio de borosilicato, parcialmente recubiertas con cera y pulidas a fuego. Tras la formación del sellado y la perforación, sólo se aceptaron los registros en los que la resistencia de acceso de la pipeta y la corriente de fuga fueron inferiores a 20 M $\Omega$  y 20 pA, respectivamente. El cambio entre la configuración de fijación de voltaje y de fijación de corriente se realizó usando la herramienta "Gentle-CC-Switch" implementada en el software PULSE. Esta herramienta mantiene el potencial de la membrana celular mientras cambia el modo de configuración, evitando la activación celular. Se estimaron los cambios de capacidad de la membrana celular mediante la técnica de Lindau-Neher implementada como la característica "Sine+DC" del software exclusivo "PULSE". Se aplicó una onda sinusoidal de amplitud pico a pico de 70 mV y 1 kHz a un potencial de mantenimiento de -80 mV. Se realizó el análisis de los datos en un ordenador personal usando el software IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon). A menos que se establezca lo contrario, los datos se facilitan como la media  $\pm$  E.E.M. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron usando la prueba de la t de Student para datos emparejados.

El programa informático que controla el amplificador permite generar órdenes que posibilitan el registro automático durante un determinado tiempo (denominados segmentos, ver fig. 1A) en el modo de fijación de voltaje (donde es

## ES 2 338 727 B1

posible registrar  $C_m$ ) y también en el modo de fijación de corriente. Sin embargo, para poder realizar la medida aquí propuesta se debe generar una secuencia automatizada de órdenes en el programa PULSE. En general, esta invención emplea órdenes creadas con este programa para conseguir realizar la medida a alta resolución de los eventos que se describen a continuación:

1. Registro basal de  $C_m$  en ausencia de corriente en el modo de fijación de voltaje.
2. Registro del potencial de membrana (en el modo de fijación de corriente) y de las variaciones generadas por el estímulo en  $C_m$  (en el modo de fijación de voltaje). El programa no permite el cambio de modo sin una intervención manual, lo cual impide una medición fiable de los eventos que queremos registrar puesto que tienen lugar en una escala temporal del orden de milisegundos. Además, para evitar la activación de la célula objeto de estudio por el cambio de modo, se debe aplicar una mínima corriente idéntica a la que el amplificador emplea para mantener el potencial en el modo de fijación de voltaje. Para ello, se emplea la herramienta "Gentle CC-Switch" de PULSE. De no hacerlo así el propio cambio sería un estímulo que enmascararía la respuesta a estudiar. La automatización de estos pasos es de suma importancia puesto que posibilita el registro, a alta resolución, de la respuesta secretora producida por un estímulo despolarizante aplicado en el modo de fijación de corriente.
3. El registro de la respuesta secretora (es decir, de la variación de  $C_m$ ) ha de realizarse en el modo de fijación de voltaje y, por ello, el cambio de modo CC a VC con suma rapidez tal y como se ha descrito anteriormente para no perder la sincronía estímulo-respuesta. En general, el cambio se realizará al voltaje fijado en primera instancia, por lo que se emplea la herramienta "Last V-membrane" del programa, implementada para ser ejecutada de manera automática en una secuencia u orden automatizada para evitar retrasos en la aplicación del comando y la activación celular.

### Ejemplo 3

#### *La respuesta secretora provocada por ACh*

Usando nuestro nuevo protocolo, examinamos el acoplamiento estímulo-secreción y las posibles contribuciones de los receptores nicotínicos y muscarínicos y los canales de  $Ca^{2+}$  a la exocitosis desencadenada por ACh. Para seleccionar la concentración de ACh para su uso en los experimentos, se aplicaron en primer lugar pulsos de 200 ms (el pulso fiable más pequeño emitido por nuestro sistema de perfusión) de ACh 30  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M y 1 mM a la superficie de las células cromafines humanas con fijación del voltaje. Los trazados representativos originales de cada concentración de agonista se muestran en la figura 1a. Los picos de corriente ( $I_{ACh}$ ) y carga ( $Q_{ACh}$ ) producidos por ACh según la concentración de agonista se muestran en las figuras 1b y c, respectivamente. Las corrientes máximas se obtuvieron usando ACh 300  $\mu$ M. A 1 mM, el agonista produjo una segunda corriente pico, que se atribuye al bloqueo del canal abierto por el agonista tal como se ha descrito anteriormente (Maconochie y Knight, 1992, J. Physiol. 454:129-153). Basándose en estos resultados, usamos ACh 300  $\mu$ M para el resto de los experimentos, ya que esta concentración era suficiente para producir buenas corrientes, y el gran rebrote producido usando ACh 1 mM casi nunca apareció. ACh (300  $\mu$ M) produjo picos de corriente de  $2,1 \pm 0,2$  nA e incrementos de capacidad de  $93,4 \pm 20$  fF (n=17). Durante la activación de la corriente, también pudieron observarse grandes incrementos de la conductancia de membrana ( $G_m$ ), que volvieron al valor inicial en  $2 \pm 0,3$  s. Dado que los grandes cambios de la conductancia afectan a las mediciones de capacidad, se determinaron éstas después de haber cesado los aumentos de  $G_m$  (Figura 1d).

Para determinar la respuesta secretora global provocada por ACh a través de los registros de la  $C_m$ , se diseñó un nuevo protocolo como un procedimiento de tres etapas (Figura 2a-c). En la primera etapa (etapa 1, figura 2a) se aplicó en la configuración de la fijación de voltaje (VC) una onda sinusoidal durante 1 s antes de la perfusión de 200 ms de ACh a un potencial de mantenimiento de -80 mV. Después se registró la corriente durante un periodo de 2 s, durante el que se mantuvo constante el potencial, y finalmente se volvió a la onda sinusoidal durante 58 s, para permitir la medición de la capacidad de la membrana plasmática ( $C_m$ ). Esta primera etapa perseguía dos objetivos: determinar la exocitosis de las vesículas producidas por los componentes nicotínicos y muscarínicos de la respuesta secretora provocada por ACh, y establecer la exocitosis inicial de modo que la respuesta exocitótica total podría calcularse posteriormente en la etapa 3.

En la etapa 2 (etapa 2, figura 2b), se seleccionó la configuración de la fijación de corriente (CC), y 1 s después, se aplicó de nuevo un pulso de ACh de 200 ms, registrando los cambios en el potencial de membrana durante 3 s. Se diseñó esta segunda etapa para permitir que ACh despolarizara la célula, para registrar los cambios del potencial de membrana producidos por ACh, y para identificar los diferentes elementos que dan lugar a esta respuesta despolarizante.

En la etapa final (etapa 3, figura 2c), se volvió a la configuración VC, y se aplicó una onda sinusoidal a un  $V_h$  de -80 mV durante 60 s. En esta etapa, pudo medirse la respuesta secretora completa inducida por ACh en la etapa 2, usando el trazado de  $C_m$  justo antes de la etapa 2 como la referencia de la capacidad basal.

La figura 2d muestra los resultados de la aplicación del protocolo triple descrito anteriormente a una célula cromafín humana. En la etapa 1, la perfusión con ACh 300  $\mu$ M durante 200 ms produjo una corriente de 2,38 nA y un

## ES 2 338 727 B1

incremento de la capacidad de 156 fF. En la etapa 2, se observó una despolarización inicial con un pico a +45 mV, que disminuyó hasta -8,5 mV y se mantuvo casi como una “meseta” y finalizó a -22,8 mV. La etapa 3 reveló un aumento de la  $C_m$  de 227 fF tras la perfusión con ACh durante 200 ms, seguido de una endocitosis que presentó una constante de tiempo de 51,5 s. Se sometió a prueba este protocolo en 12 células, dando los siguientes resultados:  $2,2 \pm 0,3$  nA y  $100,4 \pm 27,3$  fF en la etapa 1, un pico de despolarización de  $+49,3 \pm 2,8$  mV y una despolarización de “meseta” que comenzó a  $-8,8 \pm 1,3$  mV y finalizó a  $-23,9 \pm 1$  mV en la etapa 2, y  $178,2 \pm 41,6$  fF en la etapa 3. Antes de que se realizara el protocolo triple, se emitieron tres pulsos iniciales de ACh en el modo VC con intervalos entre pulsos de 5 min., dando respuestas de capacidad y corriente similares (datos no mostrados).

### 10 Ejemplo 4

#### *Componente nicotínico de la respuesta a ACh*

15 Para investigar la naturaleza de la respuesta a ACh, se bloqueó farmacológicamente el receptor nicotínico usando mecamilamina ( $10 \mu\text{M}$ ) y después se emprendieron las etapas 1 y 2 del protocolo (figura 2e). En la etapa 1 se aplicaron cada 5 min. pulsos de 200 ms de ACh  $300 \mu\text{M}$  para conseguir respuestas secretoras reproducibles mientras se evitaba la desensibilización del receptor nicotínico. Esto produjo corrientes similares de una amplitud de 1,5 nA. La etapa 2 reveló la despolarización típica de doble fase provocada por ACh descrita anteriormente. Tras 3-4 pulsos de respuestas a ACh similares, se perfundió mecamilamina  $10 \mu\text{M}$  5 min. antes de realizar el siguiente protocolo completo. Se bloquearon tanto los incrementos de la capacidad como de corriente mediante mecamilamina, que también se perfundió durante la aplicación de ACh. Por tanto, los pulsos de ACh cortos activaron sólo las corrientes nicotínicas, que fueron las responsables de las respuestas exocitóticas correspondientes. A continuación, se realizó la etapa 2 del protocolo, todavía en presencia de mecamilamina. ACh no pudo producir ningún efecto despolarizante sobre el potencial de membrana. Por tanto, la despolarización provocada por pulsos de ACh de 200 ms pudo atribuirse completamente a la activación del receptor nicotínico por el agonista. A partir de estos resultados, podemos concluir que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor nicotínico desencadena el proceso secretor a potenciales de membrana hiperpolarizados antes de que se hayan activado los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). La cuestión que surge ahora es si los canales de sodio dependientes de voltaje (CSDV) también contribuyen a la respuesta de despolarización una vez que se ha alcanzado el potencial de membrana umbral. Se aplicó tetrodotoxina (a una concentración de  $2 \mu\text{M}$ ) antes de la etapa 2, y se produjo la misma curva de despolarización. Sólo el pico de voltaje a +45 mV se bloqueó por la toxina (figura 2f). Por tanto, la inyección de la corriente que fluye inicialmente a través del receptor nicotínico es suficiente para conseguir el potencial umbral al que pueden activarse los CSDV, y posiblemente los CCDV.

35 A partir de la correlación entre la corriente nicotínica y la curva de despolarización (figura 3a), fue posible determinar que se alcanzó la despolarización umbral antes de que la corriente hubiera obtenido su amplitud máxima. Esto indica que se necesitan corrientes más pequeñas que la corriente al pico para obtener la respuesta de despolarización (véase a continuación). También, si la corriente nicotínica inicial era suficiente para desencadenar el acontecimiento despolarizante, surge la cuestión con respecto a si la corriente minúscula que fluye a través del receptor nicotínico en su estado desensibilizado desempeña un papel en el proceso de despolarización.

45 Para determinar la posible relevancia de esta corriente y su correlación con la despolarización obtenida, se aplicó el agonista durante periodos prolongados de tiempo. Los registros originales de la corriente nicotínica y la despolarización de membrana plasmática provocada por 15 s de perfusión con el agonista, se proporcionan en la figura 3b. Sorprendentemente, la “meseta” de despolarización siempre persistió hasta la eliminación del agonista, a pesar del hecho de que las corrientes nicotínicas se desensibilizaron completamente. Cuando se perfundió ACh durante 15 s, las corrientes nicotínicas alcanzaron un estado estacionario de  $15,45 \pm 3,6$  pA ( $n=4$ ) en 5 s a partir de la corriente pico. Debe considerarse que el flujo real de corriente a través del receptor desensibilizado al correspondiente potencial en la curva de despolarización podría ser incluso más pequeño que el registrado a -80 mV, debido a la dependencia con el voltaje de la corriente nicotínica (Zhou y Neher, 1993, *Pflugers Arch.*, 425:511-517). Esto sugiere que se necesita como elemento primordial, la presencia del agonista para mantener la despolarización por medio de la inyección de unos cuantos pA de corriente a través del receptor nicotínico.

55 Para corroborar esta idea, también se examinó la relación entre la duración de la corriente nicotínica y la duración de la despolarización de la membrana plasmática en respuesta a pulsos de 200 ms de ACh  $300 \mu\text{M}$ , y se encontró que la respuesta de despolarización era dependiente de la duración de la corriente nicotínica (figura 3c,  $r = 0,93$ ,  $r$  significa el coeficiente de regresión de Pearson). Finalmente, comparamos las despolarizaciones provocadas por la corriente nicotínica en condiciones de control (1,55 nA) con las obtenidas tras la el lavado parcial del bloqueo del receptor nicotínico con mecamilamina (226 pA) en la misma célula (figuras 3d-e). Ambas corrientes produjeron curvas de despolarización idénticas en la configuración CC. Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon las curvas de despolarización provocadas por las corrientes nicotínicas producidas por ACh  $100 \mu\text{M}$  y 1 mM para la misma célula (datos no mostrados). Por tanto, la duración de la respuesta de despolarización era independiente de la carga total que fluye a través del receptor (la figura 3f,  $r = 0,49$ ).

65 En resumen, se examinó el proceso de acoplamiento estímulo-secreción en células cromafines de glándula suprarrenal humana usando la técnica de “patch-clamp”. Lo que se investigó en primer lugar fue la función del receptor nicotínico. Los pulsos de 200 ms de ACh  $300 \mu\text{M}$  en la configuración VC produjeron respuestas exocitóticas en células cromafines humanas que se bloquearon por mecamilamina ( $10 \mu\text{M}$ ), un antagonista selectivo del receptor nicotínico.

## ES 2 338 727 B1

Este experimento reveló que los receptores nicotínicos fueron responsables del inicio del proceso que conduce a la respuesta exocitótica provocada por pulsos cortos de ACh en las células cromafines humanas. Esta secreción está desencadenada por el  $\text{Ca}^{2+}$  que fluye a través del receptor, puesto que la fijación del voltaje a -80 mV evita la activación de los CCDV. Además, la respuesta de despolarización obtenida en la configuración de fijación de corriente se bloqueó completamente por la mecamilamina.

### Ejemplo 5

#### 10 *Canales de $\text{Ca}^{2+}$*

La secreción provocada en la etapa 3 tras la configuración de fijación de corriente ( $178,2 \pm 41,6$  fF) difirió significativamente de la producida en la etapa 1 ( $100,4 \pm 27,3$  fF) (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ). Cuando se normalizó, la secreción en la etapa 3 fue 2.013 veces la obtenida en la etapa 1 (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ) (figura 4a). Esto significa que debe existir una fuente adicional de  $\text{Ca}^{2+}$ , además del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor nicotínico captado durante la etapa 2. El candidato más plausible para esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  son los CCDV. Para comprobar esta posibilidad, se realizó el protocolo de tres etapas antes y después de perfundir la célula con  $\text{Cd}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$ , usando como estímulo pulsos de 200 ms de ACh 300  $\mu\text{M}$ . Se bloquearon las corrientes nicotínicas y la carga correspondiente hasta la extensión del  $12 \pm 3,5\%$  y el  $29,5 \pm 5,4\%$  por el catión ( $n=6$ ), respectivamente. Por tanto, para investigar mejor la contribución de los CCDV a la exocitosis producida por ACh, se estudió el efecto de  $\text{Cd}^{2+}$  sobre los CCDV en las células en las que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor nicotínico no desencadenó secreción. En esta situación, el bloqueo por  $\text{Cd}^{2+}$  de la exocitosis pudo atribuirse completamente al bloqueo de los CCDV por el catión (figura 4b-d) ( $n=4$ ). Por tanto, el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los receptores nicotínicos a potenciales hiperpolarizados contribuyó al proceso exocitótico tanto como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV a potenciales de membrana despolarizados.

La curva de despolarización no se vio afectada por  $\text{Cd}^{2+}$ , indicando la no contribución de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV a la respuesta de despolarización. Sólo se observó un claro bloqueo de la despolarización de la membrana plasmática por el catión con pulsos de ACh más largos (figuras 4e-f). Estos datos indican que las corrientes nicotínicas fueron suficientes para provocar la despolarización producida por pulsos cortos del agonista (200 ms). Sin embargo, cuando se aplicaron estímulos largos (15 s), se requirió la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV para mantener la respuesta despolarizante.

Se examinó la contribución de los CSDV al acoplamiento estímulo-secreción en las células cromafines humanas usando tetrodotoxina (TTX). Se observó que estos canales contribuyeron exclusivamente a generar la despolarización pico bloqueada por la toxina. La respuesta de despolarización restante no se vio afectada por TTX. Esto apunta de nuevo a la corriente nicotínica como el único elemento que desencadena el proceso de despolarización, y por tanto, el acontecimiento secretor. Estos resultados concuerdan bien con los datos registrados, obtenidos también a través de las técnicas electrofisiológicas (Brandt *et al.*, 1976, *J. Physiol.* 263:417-439; Biales *et al.*, 1976, *J. Physiol.* 262:743-753; Kidokoro y Ritchie, 1980, *J. Physiol.* 307:199-216). Debe hacerse hincapié en que el alto voltaje pico de  $49,3 \pm 2,8$  mV conseguido durante la despolarización provocada por ACh es muy superior que el máximo +30 mV obtenido durante los potenciales de acción provocados en las células cromafines bovinas o de rata (Novara *et al.*, 2004, *J. Physiol.*, 558:433-4498; González-Rubio *et al.*, 2006, *Eur. J. Pharmacol.* 535, 13-24).

### 45 Ejemplo 6

#### *Papel de los canales iónicos operados por ligandos en la secreción acoplada a estímulo*

Los canales iónicos operados por ligandos se han considerado clásicamente como inductores de cambios rápidos en la actividad eléctrica. Los datos presentados en el presente documento sugieren que éste es realmente el caso: las corrientes nicotínicas pudieron iniciar el acontecimiento de despolarización y desencadenar el proceso secretor incluso a potenciales de membrana hiperpolarizados. Sin embargo, nuestros datos también proporcionan pruebas de funciones a largo plazo de los receptores nicotínicos neuronales, tal como se sugirió previamente (Mulle *et al.*, 1992, *Neuron*, 8:135-143). Por tanto, observamos aquí que estos receptores contribuyen a mantener la señal de despolarización durante periodos prolongados de tiempo, permitiendo la liberación continuada de neurotransmisores. El hecho de que estos datos se obtuvieron en células cromafines humanas se suma al interés de estos resultados.

La contribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  a la exocitosis total provocada por ACh se confirmó mediante el bloqueo por  $\text{Cd}^{2+}$  del aumento de la capacidad de la membrana plasmática detectado entre las etapas 1 y 3 del protocolo. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ha demostrado ser el principal desencadenante del proceso exocitótico, usando como estímulo pulsos largos de ACh (Douglas y Rubin, 1961, *J. Physiol.* 159:40-57). En el presente documento, mostramos que la secreción provocada por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor nicotínico pudo producir una cantidad similar de fusión de vesículas secretoras cuando se aplicó el agonista rápida y brevemente (200 ms). Esta observación clave puede explicarse de varias maneras posibles incluyendo: i) la ubicación conjunta del receptor nicotínico y las zonas exocitóticas activas en el posible caso de una baja fracción de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  que pasa a través del receptor en las células cromafines humanas, tal como ocurre en las células cromafines bovinas (2,5%; Zhou y Neher, 1993, *Pflugers Arch*, 425:511-517); ii) la amplificación de esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  discreta a través del receptor mediante un mecanismo relacionado con el retículo endoplasmático (tal como en las células cromafines bovinas, Mollard *et*

## ES 2 338 727 B1

*al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sic. USA, 92:3065-3069); iii) la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor nicotínico a potenciales de membrana hiperpolarizados similar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV a potenciales de membrana despolarizados (por ejemplo, en el núcleo habenuar medial de la rata, Mulle *et al.*, 1992, Neuron, 135-143).

5 El hecho de que  $\text{Cd}^{2+}$  no afectó a la curva de despolarización producida por pulsos de ACh breves indica que la entrada de  $\text{Na}^+$  a través del receptor nicotínico, pero no el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los CCDV, es suficiente para que pulsos de ACh cortos consigan la despolarización. Sin embargo, usando pulsos de ACh largos como estímulo,  $\text{Cd}^{2+}$  bloqueó la curva de despolarización. Por tanto, se captaron los CCDV por la corriente nicotínica que fluye a través del receptor nicotínico desensibilizado para mantener la respuesta de despolarización.

10 En resumen, los experimentos proporcionan los primeros datos de las células cromafines humanas obtenidos en un análisis detallado de la exocitosis producida por los receptores nicotínicos. En general, estos resultados proporcionan información valiosa para la comprensión del acontecimiento excitotóxico en células cromafines humanas, así como los conocimientos fisiológicos y farmacológicos del proceso de acoplamiento estímulo-secreción en estas células.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 338 727 B1

## REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la respuesta excitotónica de una célula a un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor C1 correspondiente a la  $C_m$  de la célula en estado basal
- b. cambiar rápidamente a modo de fijación de corriente y aplicar dicho estímulo y
- c. cambiar rápidamente a modo de fijación de voltaje y determinar un valor C2 correspondiente a la  $C_m$  de la célula

en donde el valor de la diferencia entre los valores C2 y C1 es una medida de la respuesta excitotónica de la célula.

2. Un método según la reivindicación 1 en el que la transición entre las etapas a y b y/o entre las etapas b y c se efectúa en el orden de milisegundos.

3. Un método para medir el efecto de la despolarización de membrana en una célula sobre la respuesta excitotónica de dicha célula a un estímulo despolarizante que comprende las etapas de

- a. determinar en modo de fijación de voltaje un valor C1 correspondiente a la  $C_m$  de la célula en estado basal (C1),
- b. poner en contacto dicha célula con dicho estímulo y determinar en modo de fijación de voltaje un valor C2 correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estimulación
- c. eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor C3 correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización,
- d. cambiar rápidamente a modo de fijación de corriente y aplicar de nuevo dicho estímulo y
- e. cambiar rápidamente a modo de fijación de voltaje y determinar un valor C4 correspondiente a la  $C_m$  de la célula.

en donde un valor positivo de la diferencia  $(C4-C3) - (C2-C1)$  indica que al menos parte de la respuesta excitotónica de la célula al estímulo requiere de la despolarización de la membrana.

4. Un método según la reivindicación 2 en el que la transición entre las etapas c y d y/o entre las etapas d y e se efectúa en el orden de milisegundos.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el estímulo despolarizante se selecciona del grupo de un ligando capaz de provocar la apertura de un canal iónico, un ligando capaz de provocar un trasiego iónico a través de la membrana de la célula y una inyección de corriente que genere un potencial de acción en el modo de fijación de corriente.

6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la aplicación del ligando se realiza de manera ultracorta, preferiblemente del orden de milisegundos, y/o repetitiva, preferiblemente con una frecuencia de 0.1 a 100 Hertzios.

7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la célula se selecciona del grupo de una célula cromafín y una célula pancreática  $\beta$ .

8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la célula es una célula cromafín y el estímulo despolarizante es acetilcolina o al menos un agonista nicotínico.

9. Un método según las reivindicaciones 2 a 8 en el que la etapa inicial de determinación de la  $C_m$  en respuesta al estímulo se lleva a cabo en presencia de al menos un antagonista del receptor.

10. Un método según la reivindicación 9 en el que la célula secretora es una célula cromafín, el ligando es un agonista de un receptor acoplado a un canal iónico y el antagonista es un antagonista nicotínico.

11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que la medida se lleva a cabo en presencia de un potenciador/activador de los receptores.

12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que la célula posee al menos un canal de calcio dependiente de voltaje.

## ES 2 338 727 B1

13. Un método según la reivindicación 12 en el que el canal de calcio dependiente de voltaje se selecciona del grupo de un canal tipo L, un canal tipo N, un canal tipo P/Q, un canal tipo T y un canal tipo R.
14. Un método según la reivindicación 12 ó 13 en el que la célula se ha tratado previamente con al menos un compuesto que causa la eliminación de las reservas intracelulares de calcio.
15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en el que la medida se lleva a cabo en presencia de un potenciador/activador de los canales de calcio.
16. Un método para la identificación de inhibidores o activadores de la secreción en respuesta a un estímulo despolarizante que comprende las etapas de
- determinar en modo de fijación de voltaje un valor  $C_1$  correspondiente a la  $C_m$  basal
  - cambiar rápidamente a modo de modo de fijación de corriente y aplicar dicho estímulo en presencia del compuesto cuya actividad inhibitora o activadora se desea ensayar y
  - cambiar rápidamente a modo de modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_2$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula
- en donde un valor de la diferencia entre  $C_2$  y  $C_1$  menor que el valor de dicha diferencia obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es inhibidor de la secreción en respuesta al estímulo despolarizante y donde un valor de la diferencia entre  $C_2$  y  $C_1$  mayor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es activador de la secreción en respuesta al estímulo despolarizante.
17. Un método según cualquiera de las reivindicación 16 en el que la transición entre las etapas a y b y/o entre las etapas b y c se realiza en el orden de milisegundos.
18. Un método para la identificación de inhibidores o activadores de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana por un estímulo despolarizante que comprende las etapas de
- determinar en condiciones de voltaje constante un valor  $C_1$  correspondiente a la  $C_m$  basal de las células,
  - poner en contacto dicha células con dicho estímulo en modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_2$  correspondiente a la  $C_m$  de las células tras la estimulación,
  - eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor  $C_3$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización, y
  - cambiar rápidamente a modo de modo de fijación de corriente y aplicar de nuevo dicho estímulo en presencia del compuesto cuya actividad inhibitora o activadora se desea ensayar y
  - determinar a continuación en modo de fijación de voltaje un valor  $C_4$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula
- en donde un valor de  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  menor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es inhibidor de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana y donde valor de  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  mayor que el obtenido en ausencia de dicho compuesto indica que el compuesto es activador de la secreción en respuesta a la despolarización de la membrana.
19. Un método para la identificación de inhibidores o activadores de un canal de calcio dependiente de voltaje en una célula que contiene dicho canal de calcio dependiente de voltaje y al menos un receptor acoplado a un canal catiónico que comprende
- determinar en condiciones de voltaje constante un valor  $C_1$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula,
  - poner en contacto dicha célula con un estímulo despolarizante en modo de fijación de voltaje,
  - determinar un valor  $C_2$  correspondiente a la  $C_m$  de las células tras la estimulación,
  - eliminar el estímulo y mantener la célula en condiciones de voltaje constante hasta que se estabilice la  $C_m$  y determinar un valor  $C_3$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula tras la estabilización,
  - cambiar rápidamente a condiciones de corriente constante y añadir de nuevo dicho estímulo despolarizante en presencia del compuesto cuya actividad como activador o inhibidor de los canales de calcio se desea ensayar hasta que el potencial de membrana sea el adecuado para la apertura del canal de calcio dependiente de voltaje y

## ES 2 338 727 B1

f. cambiar rápidamente al modo de fijación de voltaje y determinar un valor  $C_4$  correspondiente a la  $C_m$  de la célula

5 en donde un valor de la diferencia  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  menor que el aumento observado en ausencia del compuesto indica que el compuesto inhibe el canal de calcio dependiente de voltaje y donde un valor de la diferencia  $(C_4-C_3)-(C_2-C_1)$  mayor que el valor observado en ausencia del compuesto indica que el compuesto activa el canal de calcio dependiente de voltaje.

10 20. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19 en el que la transición entre las etapas d y e y/o entre las etapas e y f se realiza en el orden de milisegundos.

21. Un método según las reivindicaciones 16 a 20 en el que la célula es una célula cromafin.

15 22. Un método según la reivindicación 21 en el que el estímulo despolarizante es un agonista de un receptor de neurotransmisores acoplado a un canal iónico, preferiblemente acetilcolina o un agonista colinérgico.

23. Un programa de ordenador que incluye medios codificados para llevar a cabo los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.

20 24. Un medio legible por ordenador en el cual se almacenan medios codificados adaptados para llevar a cabo los pasos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23.

25 25. Un sistema automatizado de microelectrodos para realizar estudios de patch-clamp que contiene el programa definido en la reivindicación 23 o el medio legible definido en la reivindicación 24.

26. Un sistema según la reivindicación 25 que es un amplificador patch-clamp.

30

35

40

45

50

55

60

65

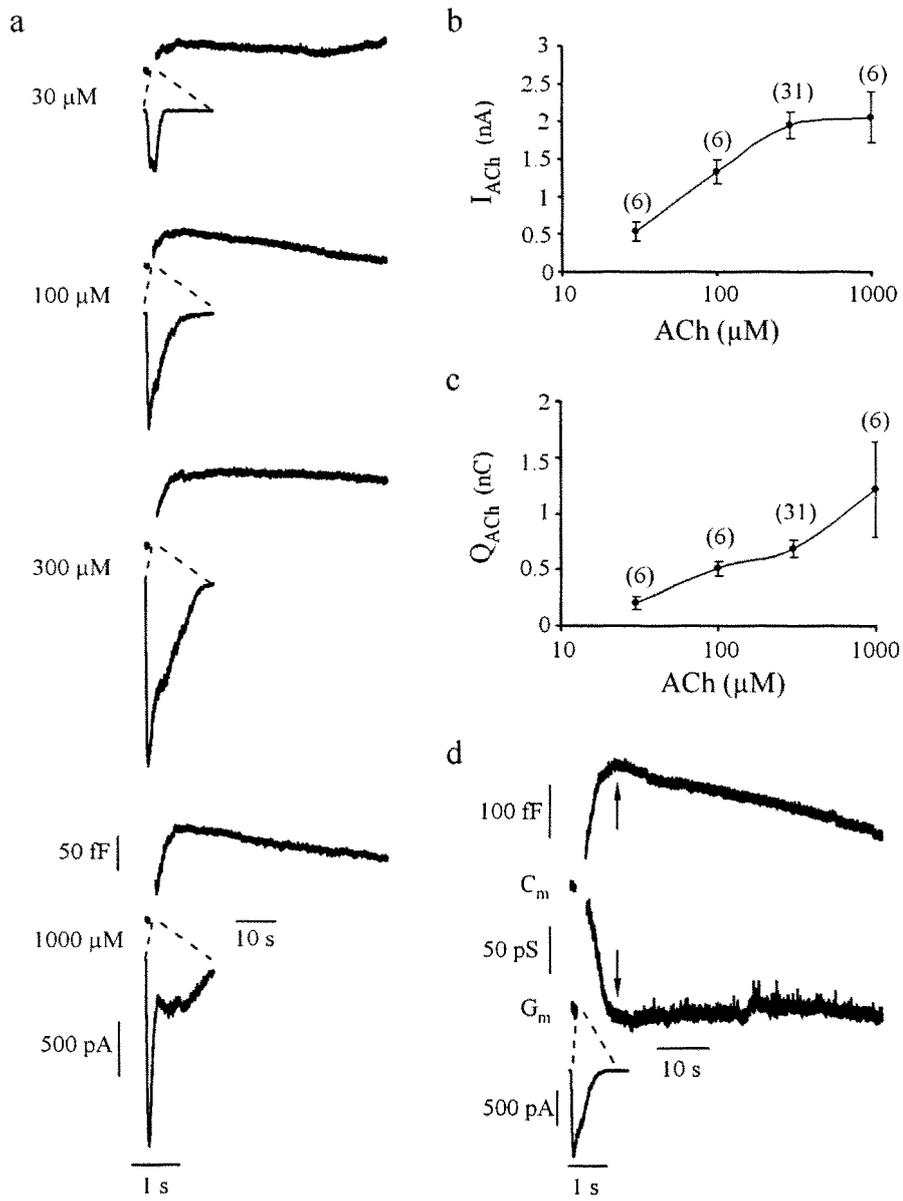


FIGURA 1

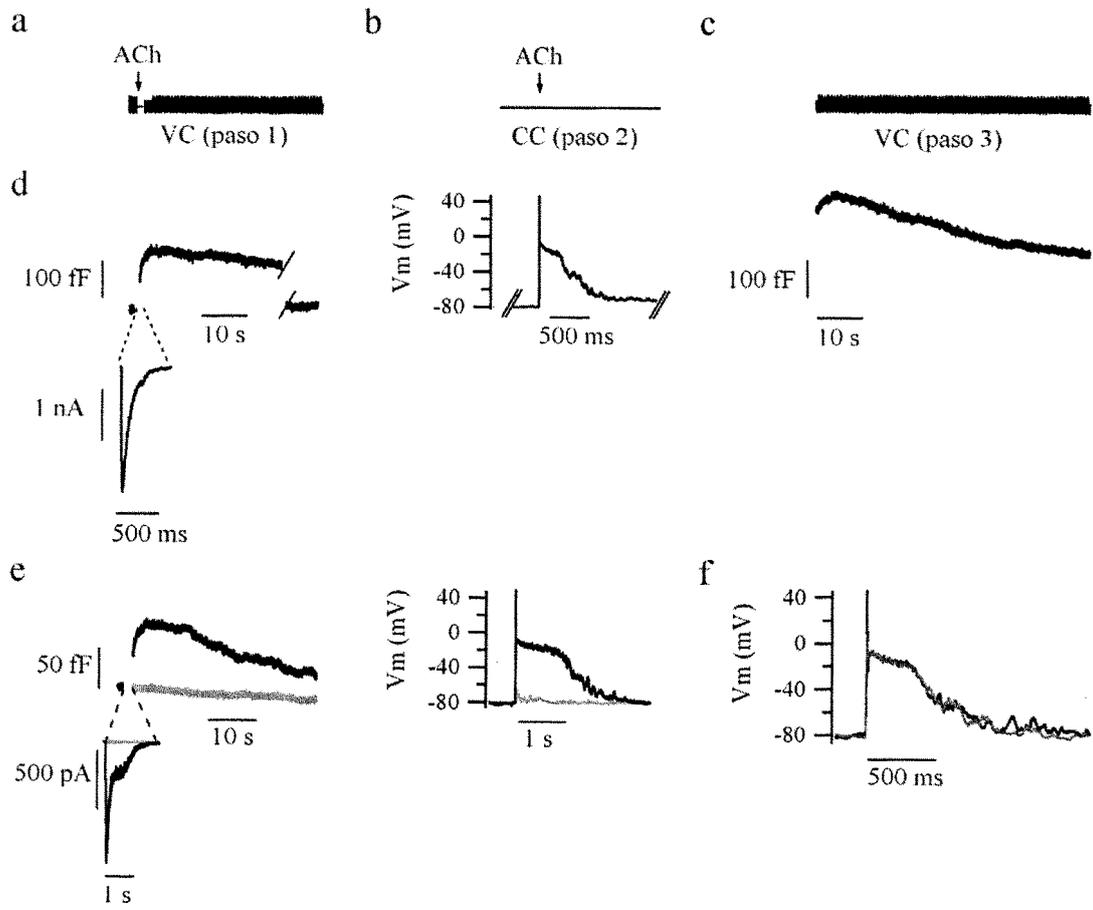


FIGURA 2

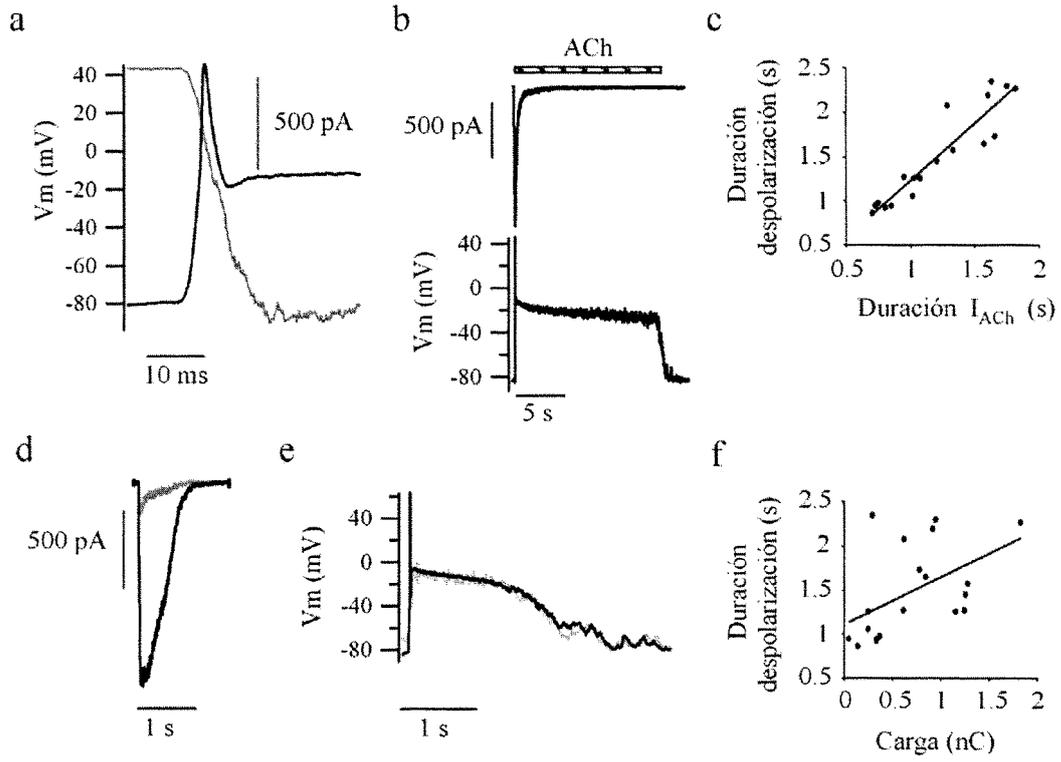


FIGURA 3

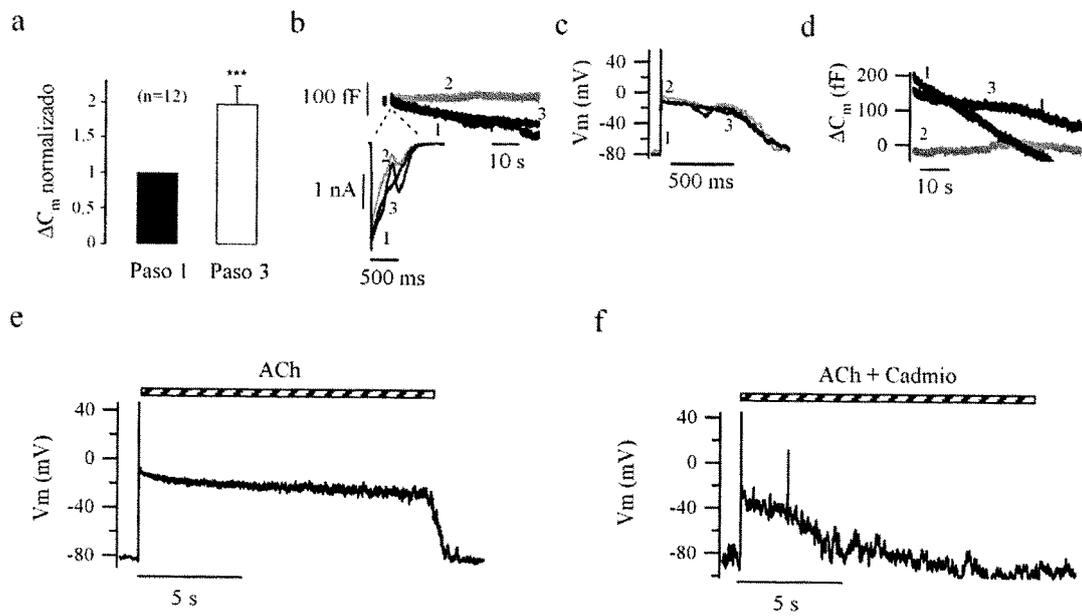


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 727

② Nº de solicitud: 200701919

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.07.2007**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/483** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DURROUX T. et al. "Effects of Acth on action potencial and calcium currents in cultured rat and bovine glomerulosa cells" en Endocrinology, 1991, vol. 129, nº 4, páginas 2139-2146.	1-4,16-20
A	PUGLISI JOSÉ L. et al "LabHEART: An interactive computer model of rabbit ventricular myocyte ion channels and Ca transport", American Journal of Physiology, diciembre 2001, vol. 281, nº 6 part 1, páginas C2049-C2060.	1-4,16-20, 23-25
A	Base de datos Inspec/IEE, AN 226305, GEBHARDT U et al. "Fast switching between voltage-and current-control of membrane clamps", resumen.	1-4,16-20
A	Base de datos BIOSIS, AN PREV199192134834, VARAS R. et al. "Current and voltage changes evoked by ACh and ATP in cat petrosal ganglion neurons", resumen.	1-4,8, 16-20
A	Base de datos BIOSIS, AN PREV200100109555, LADEWIG T. et al. "Serotonergic modulation of intracellular calcium signaling via the 5HT-2AR-IP3 pathway in hypoglossal motoneurons (HGMS) of the neonatal mouse", resumen.	1-4,16-20
A	Base de datos BIOSIS, AN PREV199191003089, AKAIKE A. et al. "Voltage and current clamp studies of muscarinic and nicotinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells", resumen.	1-4,7,8, 10,16-21
A	Base de datos BIOSIS, AN PREV199294130348, NOONEY J M et al. "A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture", resumen.	1-4,7,8, 10,16-21

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.04.2010

Examinador

A. Cardenas Villar

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 338 727

② Nº de solicitud: 200701919

③ Fecha de presentación de la solicitud: **04.07.2007**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/483** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Base de datos BIOSIS, AN PREV200300283488, LOPANTSEV V. et al. "Glutamatergic neurotransmisión is altered in neocortical neurons from SV2 knockout mice", resumen.	1-22,25
A	Base de datos MEDLINE/NLM, AN NLM8867052, FINNEGAN J M et al. "Comparison of cytosolic ca <sup>2+</sup> and exocytosis responses from single rat and bovine chromaffin cells", resumen.	7,8,21

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.04.2010

Examinador

A. Cardenas Villar

Página

2/2