



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

OSCILACIONES DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN CÉLULAS CROMAFINES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A:
Y A S M Í N E S C O B E D O L O Z O Y A

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres

Este trabajo de tesis fue realizado bajo la supervisión del Dr. Arturo Hernández Cruz, en el departamento de Biofísica y Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y con el apoyo del CONACYT, Proyecto 42662-Q, DGAPA IN226403 e IMPULSA 03 UNAM.

One can pay back the loan of gold, but one dies forever in
debt to those who are kind. ~Malayan Proverb

Agradecimientos

Ofelia y Juan Manuel, Lalo, Emma y Germán Martínez, al Dr. Cifuentes y a David, con quienes vivo por siempre en deuda.
Gracias.

Gracias a Arturo Hernández Cruz, mi tutor académico y director de tesis, que al abrirme las puertas de su laboratorio me abrió también las puertas al ejercicio de la investigación científica como profesión. Gracias a los sinodales que contribuyeron a la revisión de este trabajo, la Dra. Elvira Galarraga Palacio, la Dra. Martha Pérez Armendáriz, la Dra. Leticia Verdugo Díaz y el Dr. Fredy Cifuentes Navarro. Gracias también a todos los miembros del laboratorio BL-305, tanto por su ayuda como por su compañía, en especial agradezco a Nicolás Jímemez quién me brindó su ayuda técnica en numerosas ocasiones, y a Diana Millán Aldaco, sin cuya invaluable disponibilidad y excelentes preparaciones de células este trabajo hubiese resultado imposible.

Resumen

Las células cromafines aisladas de la médula adrenal del feto disparan potenciales de acción continuamente en cultivo a una frecuencia promedio de ~1 Hz. Esta actividad eléctrica es espontánea, es decir, no depende de la estimulación por agonista. Los mecanismos que permiten a estas células disparar espontáneamente no se han caracterizado hasta ahora. En este trabajo, cuantificamos la actividad espontánea de las células cromafines en dos puntos de su desarrollo haciendo uso de la técnica de 'patch-clamp' en configuración de célula adosada para registrar extracelularmente las corrientes provocadas por el disparo de los potenciales de acción. Nuestro objetivo principal fue identificar el papel de las corrientes intrínsecas en la generación de la actividad eléctrica. Examinamos el efecto de bloqueadores de las principales conductancias expresadas en estas células sobre la amplitud y frecuencia de las corrientes de acción registradas. Nuestros resultados indican que en las células fetales los canales de tipo T son requeridos para iniciar la depolarización que permite el disparo de los potenciales de acción mientras que los canales de Na^+ juegan un papel secundario; por otro lado, en las células neonatales, los canales de Na^+ son los principales encargados de iniciar la depolarización que permite el disparo del potencial de acción.

Summary

Chromaffin cells isolated from the fetal adrenal medulla fire action potentials continuously at an average rate of 1 Hz in culture. This electrical activity is called 'spontaneous' because it persists in the absence of stimulation. To date, the mechanisms that allow these cells to fire spontaneously remain unclear. In this study, we used the 'patch-clamp' technique in cell-attached mode to record the extracellular currents elicited by action potential firing in chromaffin cells isolated at two different developmental stages. We focused on examining the role played by the intrinsic currents of the cell on the generation of action potentials. We examined the effect of well-known blockers of the main channels expressed in these cells on the amplitude and frequency of action currents. Our results indicate that in fetal chromaffin cells T-type calcium channels are essential initiators of the depolarization that triggers the firing of action potentials while sodium channels play an accessory role. In contrast, neonatal cells, sodium channels are the main initiators of the depolarization that triggers action potentials.

Índice

Resumen	iv
Summary	v
Índice	vi
Índice de figuras y tablas	ix
Abreviaturas	xi
Introducción	
El sistema nervioso autónomo	1
Respuesta al estrés	3
Ontogenia y características de la médula adrenal	6
Mecanismo de secreción	7
Propiedades eléctricas y generación del potencial de acción	9
Antecedentes	
La actividad espontánea y la respuesta a la estimulación de receptores a secretagogos	16
Respuesta a agonistas a los receptores metabotrópicos	18
Relación entre la dinámica del calcio intracelular y la actividad eléctrica de la membrana	22
Generación de la actividad eléctrica espontánea	23
La actividad eléctrica espontánea de la células cromafines fetales	25
Papel de la secreción de catecolaminas en la respuesta fetal a la hipoxia	26
Justificación del proyecto	29
Hipótesis	30

Objetivo General	31
Objetivos Particulares	31
Metodología	
Animales	33
Cultivo Celular	33
Preparación de soluciones	35
Preparación de drogas	36
Registro electrofisiológico: Técnica de fijación de voltaje	37
Registro electrofisiológico de corrientes de Na ⁺ y Ca ⁺	39
Registro electrofisiológico de corrientes de acción: Bases del método.	42
Registro electrofisiológico de corrientes de acción: Procedimiento	45
Análisis de datos	46
Resultados	
Las células cromafines neonatales disparan potenciales de acción espontáneamente a una mayor frecuencia que las células neonatales	50
El bloqueo de la corriente de sodio sensible a TTX no impide el disparo de los potenciales de acción.	52
Propiedades de la corriente de sodio en células fetales y neonatales	54
La inhibición farmacológica de los canales de calcio tipo T no frena la actividad eléctrica espontánea	60
Dependencia del calcio externo de los potenciales de acción espontáneos	61

Efecto del bloqueo de los canales de potasio tipo BK sobre la actividad espontánea	65
<i>Discusión</i>	
Mecanismo de generación de la actividad espontánea en células cromafines inmaduras	67
Los potenciales de acción pueden iniciarse por fluctuaciones subumbrales del potencial de membrana	70
Papel de la secreción de catecolaminas durante la etapa fetal	71
<i>Conclusiones</i>	74
<i>Bibliografía</i>	76

Índice de figuras y tablas

Tabla I. Efecto de las catecolaminas sobre los órganos periféricos	4
Figura 1. Fases del potencial de acción	12
Tabla II. Corrientes de membrana presentes en células cromafines de rata	14
Figura 2. Representación esquemática del proceso de fijación de voltaje	38
Figura 3. Registro de corrientes en modo fijación de voltaje	44
Figura 4. Las células neonatales disparan a una mayor frecuencia que las células neonatales	51
Figura 5. Efecto de la aplicación de TTX sobre la actividad eléctrica espontánea	53
Figura 6. Efecto de TTX sobre la actividad espontánea de las células neonatales	55
Figura 7. Propiedades de la corriente de sodio en células fetales y neonatales.	57
Figura 8. Las corrientes de calcio en células cromafines	59
Figura 9. Efectos del mibefradil sobre la frecuencia de disparo de las células neonatales y fetales	62
Figura 10. La inhibición farmacológica de los canales de calcio tipo T disminuye la amplitud del componente inicial de corriente entrante de las corrientes de acción espontáneas	63

Tabla III. Efecto del mibefradil sobre las amplitudes de los componentes entrante y saliente de las corrientes de acción de las células fetales y neonatales	63
Figura 11. La ausencia de calcio ocasiona el completo cese del disparo espontáneo de las células cromafines fetales	64
Figura 12. La inhibición farmacológica de los canales de calcio tipo L abole completamente el disparo espontáneo de potenciales de acción	65
Figura 13. El bloqueo de los canales de K ⁺ tipo BK ocasiona el cese del disparo espontáneo	66

Abreviaturas

ϕ	Periodo
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bc	Bradicinina
CA's	Catecolaminas (Adrenalina y Noradrenalina)
CPA	Acido Ciclopiazónico
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración Intracelular de Calcio
Ca _v 's	Canales de Calcio dependientes de Voltaje
CbTx	Caribdotoxina
DE	Desviación Estandar
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazine-N'-2-etanosulphonic acid
E _K	Potencial de equilibrio del ion K ⁺
F	Constante de Faraday
k	Constante de Boltzman
K _v 's	Canales de K ⁺ dependientes de Voltaje
Na _v 's	Canales de Na ⁺ dependientes de Voltaje
r.p.m.	Revoluciones por minuto
R	Constante de los Gases
T	Temperatura
TTX	Tetrodotoxina
V	Voltaje
z	Valencia iónica

Introducción

Sistema Nervioso Autónomo

En los mamíferos, el control de las funciones vitales depende del sistema nervioso autónomo (SNA), que es un conjunto de neuronas y nervios eferentes que regulan la actividad de los sistemas cardiovascular, respiratorio, digestivo, y urogenital además de los ojos y la piel.

El término “nervio simpático” tiene su origen en las ideas Galeno, en cuya opinión las cadenas de nervios cuyas raíces se internan en la médula espinal concertaban el acuerdo o “simpatía” entre las diversas partes del cuerpo. En 1852, Claude Bernard comprobó que los nervios simpáticos se comunican con los órganos del cuerpo, al examinar los efectos del daño a los nervios simpáticos en animales.

El SNA se comunica también a las glándulas endocrinas, un conjunto de efectores especializados cuyas secreciones hormonales que se vierten al torrente sanguíneo, en el cual viajan hasta llegar a sus órganos blanco. Las glándulas adrenales son uno de los múltiples efectores de la división simpática del SNA; su papel en la regulación de las funciones corporales empezó a establecerse a partir de 1985 cuando Oliver y Schaffer descubrieron que la inyección de extractos de la médula adrenal a la sangre tiene efectos marcados en el sistema cardiovascular (Goldstein DS, 2000).

El trabajo de Cannon (Cannon W, 1945) marcó una nueva etapa en el estudio de la homeostasis y la función endocrina. Con sus trabajos, la glándula adrenal empezó a considerarse como parte del 'eje simpato-adrenal', una unidad cuyo papel era preservar la homeostasis durante la exposición a estímulos extremos.

El termino adrenalina surgió hasta 1950, cuando Seyle lo usó para designar a las catecolaminas secretadas de la médula adrenal durante el fenómeno que llamo 'la reacción de alarma', el primer paso para la adaptación general del organismo (Seyle H, 1950).

Numerosos trabajos en endocrinología revelaron más tarde las complejas interacciones existentes entre los nervios y las hormonas. En la actualidad, reconocemos que los conceptos promovidos por Cannon y Seyle representan una excesiva simplificación del modo en que opera el organismo. A pesar de esto, los conceptos generales promovidos por ellos siguen estando vigentes dentro del campo de la investigación de la fisiología de la respuesta al estrés, pues dieron la pauta para entender los variados efectos de la adrenalina en términos de preparar al organismo para enfrentar los retos, internos y externos, que la mayoría de los mamíferos deben superar para sobrevivir. Tales retos pueden ser resultado tanto de perturbaciones en el equilibrio interno (pérdida repentina de nutrientes metabólicos, hipotensión, cambio en el volumen intravascular, etc.) como de la competencia o enfrentamiento con competidores de su especie o con depredadores.

Respuesta al estrés

En términos generales, se acepta que en respuesta a amenazas globales o a insultos metabólicos, el incremento de la actividad neural recibida por la médula adrenal ocasiona la liberación de catecolaminas a la sangre venosa que sale de la glándula. La adrenalina viaja rápidamente por la sangre, alcanzando a todos los órganos del cuerpo (con excepción del cerebro) y produciendo efectos del mismo tipo que los provocados por la activación del sistema simpático (Tabla I., Cornett LE, 1989). Los receptores que median los efectos de las catecolaminas se denominan receptores adrenérgicos. Existen dos familias de receptores adrenérgicos, α y β ; los receptores de la familia α , tienen mayor afinidad por la noradrenalina que por la adrenalina y el isoproterenol. mientras que los receptores de la familia β , tienen mayor afinidad por la adrenalina y el isoproterenol que por la noradrenalina.

Los valores basales de la secreción de adrenalina se traducen en una concentración en plasma de 20 a 50 pg/ml. No obstante, estos niveles varían considerablemente de acuerdo al estado fisiológico del individuo y pueden llegar hasta 1 nM en situaciones tales como el infarto al miocardio, la hipoglicemia aguda o la cetoacidosis (Cornet LE, 1989).

Tabla I. Efecto de las catecolaminas sobre los órganos periféricos. Adaptado de Goodman y Gilman, 2001 y Norman AW y Litwack AG, 1997.

Órgano Efecto	Receptor	Respuesta
Ojos		
Iris (músculo radial)	α_1	Contracción (midriasis)
Iris (músculo ciliar)	β_2	Relajación (para ver a distancia)
Corazón		
Nodo Sino Atrial	β_1	↑ Frecuencia cardíaca
Aurículas	β_1	↑ Contractilidad ↑ Velocidad de conducción
Nodo Atrioventricular	β_1	↑ Velocidad de conducción
Fibras de Purkinje	β_1	↑ Velocidad de conducción
Ventrículos	β_1	↑ Contractilidad
Arteriolas		
Piel, mucosas y glándulas	α_1, α_2	Constricción
Cerebrales	α_1	Constricción
Músculos esqueléticos,	α_1	Constricción
Coronarias	α_1, α_2	Constricción
Renales	α_1, α_2	Constricción
Pulmones		
Músculo Bronquial	β_2	Relajación
Glándulas Bronquiales	α_1	↑
Estómago		
Motilidad y tono	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_2$	↓
Esfínteres	α_1	Contracción
Secreción	α_2	↓

Tabla I. (cont...)

Vesícula biliar y ductos	$\beta 2$	Relajación
Vejiga urinaria		
Detrusor	$\beta 2$	Relajación
Trigone y esfínter	$\alpha 1$	Contracción
Uretra	$\alpha 1$	↑ Motilidad y tono
Útero	$\alpha 1, \beta 1$	Depende del estadio del ciclo menstrual o el
Órganos reproductores	$\alpha 1$	Eyacuación
Piel		
Músculos pilomotores	$\alpha 1$	Contracción
Glándulas sudoríparas	$\alpha 1$	Ligera secreción localizada (ej. palmas de las
Bazo (capsula)	$\alpha 1$	Contracción
Hígado	$\alpha 1, \beta 2$	Glucógeno lisis
Páncreas		
Acinar	$\alpha ?$	↓ Secreción
Islotes de Lagerhans	$\alpha 2$	↓ Secreción de insulina y glucagon
Glándulas salivales	$\alpha 1$	Secreción viscosa
Glándulas lacrimales	$\alpha ?$	Secreción
Tejido Adiposo	$\beta 1, \beta 3$	Lipólisis
Células juxtaglomerulares	$\beta 1$	↑ Secreción de renina
Glándula Pineal	$\beta ?$	↑ Síntesis y secreción de melatonina

La acción de las CAs termina rápidamente después de su liberación, debido a que son rápidamente internalizadas por la mayoría de los tejidos, y degradadas por acción de las enzimas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-o-metil transferasa (COMT).

Ontogenia y características de la médula adrenal

La médula de la glándula adrenal se forma a partir los precursores del neuroectodermo que dan origen a las neuronas simpáticas y cuyo desarrollo es dependiente de NGF. Estos precursores comienzan a migrar durante el día embrionario 11.5 en la rata hasta colocarse sobre los riñones, en el centro de la masa celular formada por las células que dan origen la corteza adrenal. En este sitio las células en migración completan su desarrollo hasta convertirse en células cromafines.

El nervio esplánico provee de innervación a la médula adrenal. Esta compuesto de los axones de un grupo de neuronas preganglionares distribuidas a lo largo de la columna intermedia del asta dorsal en la médula espinal (segmentos T8-L1). Estos axones salen de la médula por el asta ventral y al final del desarrollo entran a la glándula, estableciendo sinapsis colinérgicas directamente con las células cromafines. Muchos de los componentes clave de la maquinaria de secreción están presentes aún antes del establecimiento de sinapsis colinérgicas, lo que sugiere que durante el desarrollo embrionario las células cromafines son capaces de secretar catecolaminas (ver antecedentes). La médula adrenal consta de dos poblaciones de células cromafines que se distinguen por el tipo de CA's (adrenalina o epinefrina y noradrenalina o norepinefrina) que almacenan en sus gránulos de secreción. Ambos tipos celulares presentan el mismo aspecto

histológico cuando al microscopio óptico, sin embargo las células secretoras de noradrenalina (NA) pueden distinguirse por que sus gránulos son electrodensos al microscopio electrónico (Artalejo, AR, 1995). Los gránulos contienen además otros tipos de aminas tales como histamina, dopamina y serotonina, y pueden contener trifosfato de adenosina (ATP), cromograninas y neuropéptidos.

La observación al microscopio electrónico revela la presencia de organelos vesiculares de dos tamaños distintos, los gránulos cromafines, que son vesículas de gran diámetro (300-400 nm) y contienen todos los compuestos mencionados anteriormente y un conjunto de vesículas de menor diámetro (60-90 nm) que contiene sólo catecolaminas. Al igual que las vesículas sinápticas de las neuronas, estos gránulos se descargan por exocitosis (Schmidt W, et al., 1983), característica que ha sido aprovechada por investigadores interesados en el estudio de los mecanismos de secreción neuronales y ha convertido a la célula cromafín en un modelo de exocitosis muy popular (Rettig J y Neher E, 2002).

En suma, debido a su ontogenia, conexiones anatómicas y mecanismo de liberación de hormona es justo considerar a las células cromafines como análogas a las neuronas postganglionares del sistema simpático.

Mecanismo de secreción

En todas las células endocrinas, la secreción de hormonas aumenta en respuesta a un aumento en la concentración de calcio libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), suscitado ya sea por la liberación de calcio de pozas intracelulares provocada por sus secretagogos o por la apertura de canales de calcio sensibles al voltaje en respuesta a cambios en el potencial de la membrana (Scheeger W y Mollard P, 1995).

Esta dependencia de la $[Ca^{2+}]_i$, fue explorada inicialmente por Douglas, quien usando técnicas de registro intracelular con microelectrodos, describió por primera vez los cambios en el potencial de membrana que ocurren al aplicar el agonista, así como el papel del calcio en la respuesta (Douglas WW y Rubin P, 1961). Douglas acuñó el término acoplamiento excitación-secreción ('excitation-secretion coupling') para describir este proceso.

La secreción de las células cromafines es estimulada por la acetilcolina (ACh). La ACh ejerce sus efectos a través de dos tipos de receptores, los de tipo nicotínico (nAChR) y los de tipo muscarínico (mAChR). Los nAChR son canales catiónicos no-selectivos que al ser activados, permiten la entrada de los iones sodio y calcio (Sakmann B, et al., 1980). La activación de esta corriente en una célula en reposo ($V_m \approx -70$ mV) provoca una depolarización de la membrana conocida como potencial sináptico excitatorio (PSE). Los mAChR's (M1 a M5) son receptores de siete dominios transmembranales que pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G. Su activación promueve la producción de $Insp_3$ y la liberación de calcio de los reservorios intracelulares. Este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ modula la actividad de

muchas proteínas celulares incluyendo a los canales iónicos y ocasiona un aumento de la frecuencia de disparo de potenciales de acción.

Estos dos tipos de receptores son responsables de las dos fases de la respuesta a la estimulación con ACh observadas en condiciones fisiológicas. La primera fase es un aumento rápido y transitorio de la frecuencia de disparo que se debe a la despolarización que resulta de la apertura de los nAChR's. El aumento en la frecuencia de disparo determina un aumento en la entrada de Ca^{2+} a través de Ca_v 's de tipo L. El rápido aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en microdominios cercanos a las vesículas de CAs ancladas en la membrana, causa la fusión de algunas vesículas a la membrana, y la liberación de su contenido (Becherer, 2004, Sorensten 2004). Durante a segunda fase, la frecuencia de disparo disminuye con respecto a la alcanzada durante la primera fase, pero continúa siendo mayor que la frecuencia de disparo basal. Esta fase se debe a la activación de los mAChR's y debe su duración a que éstos promueven incrementos más lentos y periódicos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Guo X, et al., 1996).

Propiedades eléctricas y generación del potencial de acción

Las células cromafines expresan una gran variedad de canales iónicos que dan origen a las características particulares de sus potenciales de acción. Su potencial de reposo se mantiene alrededor de los -60 mV y depende principalmente de E_K , pues el K^+ es el principal ion permeante en reposo

(Artalejo AR, 1997; Hollins B & Ikeda S, 1996). Su capacitancia está entre los 5 y 10 pF. Poseen una alta resistencia de membrana ($R_E = \sim 5 G\Omega$, Fenwick et al, 1989) lo que determina que fácilmente disparen potenciales de acción en respuesta a inyecciones de corriente tan pequeñas como la acarreada por la apertura de un solo canal iónico (Fenwick et al, 1989). Sin embargo, es posible que en la glándula intacta R_E sea menor, ya que mediciones de R_E en células registradas *in situ* con electrodos intracelulares (Nassar-Gentina V., 1988), o en rebanadas con electrodos de patch-clamp (Moser T, 1998) arrojan valores de 25 a 200 $M\Omega$. Esto ha dado pie a proponer que las células se encuentran acopladas eléctricamente *in situ*, aunque este acople debe ser de muy baja conductancia (Moser T, 1998).

La contribución de las diferentes clases de canales iónicos a generación del potencial de acción y la forma de éste, puede examinarse en cada fase de la onda (Ver Figura 1, los números al inicio de cada párrafo se refieren a las fases indicadas en el diagrama) :

- 1) El potencial de acción inicia cuando el PSP despolariza a la célula por arriba del umbral de disparo (Figura 1.1) logrando la activación de los canales de sodio dependientes del voltaje (Na_v 's). Una vez superado este punto crítico, la tasa de despolarización aumenta hasta un máximo de 160 Vs^{-1} . La despolarización continúa hasta llegar a los 30 mV, característica que revela la participación de los Na_v 's como iniciadores de la onda del potencial de acción (Artalejo AR, 1995, Hollins e Ikeda, 1996). En las células cromafines adultas, sólo se ha identificado un tipo de corriente de Na^+ que se caracteriza por su

inactivación rápida y su bloqueo por tetrodotoxina ($0.1 \mu\text{M}$ TTX). En las células cromafines fetales existen además canales de calcio (Ca_v 's) de tipo T (ver tabla 2, V_{ACT}) que también podrían activarse durante esta etapa y contribuir a la despolarización inicial del potencial de acción.

2). En esta fase, el potencial de acción sobrepasa el punto en que $V_m=0$. Los principales canales activos durante esta fase son los canales de sodio antes mencionados y los Ca_v 's de alto umbral (P, N, L) que empiezan a activarse por efecto de la despolarización provocada por los canales de sodio. La duración de esta fase es muy importante ya que controla el influjo de calcio a la célula y en consecuencia, la secreción de catecolaminas. 3). La fase de repolarización del potencial de acción (Figura 1) ocurre enseguida a consecuencia de dos procesos: por un lado los Na_v 's se inactivan muy rápidamente y el la entrada de Na^+ decae y por otro, la despolarización activa gradualmente a los canales de potasio dependientes del voltaje (K_v 's), cuya corriente contrarresta a la corriente de Na^+ . La activación de los Ca_v 's (P, N y L) ocurre durante esta fase. En células cromafines de rata adulta, el mayor contribuyente a la corriente de Ca^{2+} de la célula es el Ca_v tipo L (Gandia, 1995). En esta fase también se activa la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} . Estos canales (BK) son sensibles tanto a cambios en el potencial de membrana como a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en el orden de 1 a $10 \mu\text{M}$ (Conley EC, 1996), de manera que alcanzan su mayor actividad en el momento en que la entrada de Ca^{2+} por los Ca_v 's vecinos y la despolarización coinciden, al inicio de esta fase. Su actividad es fundamental

para controlar la duración del potencial de acción y el intervalo de tiempo entre disparos dentro de tren de potenciales de acción.

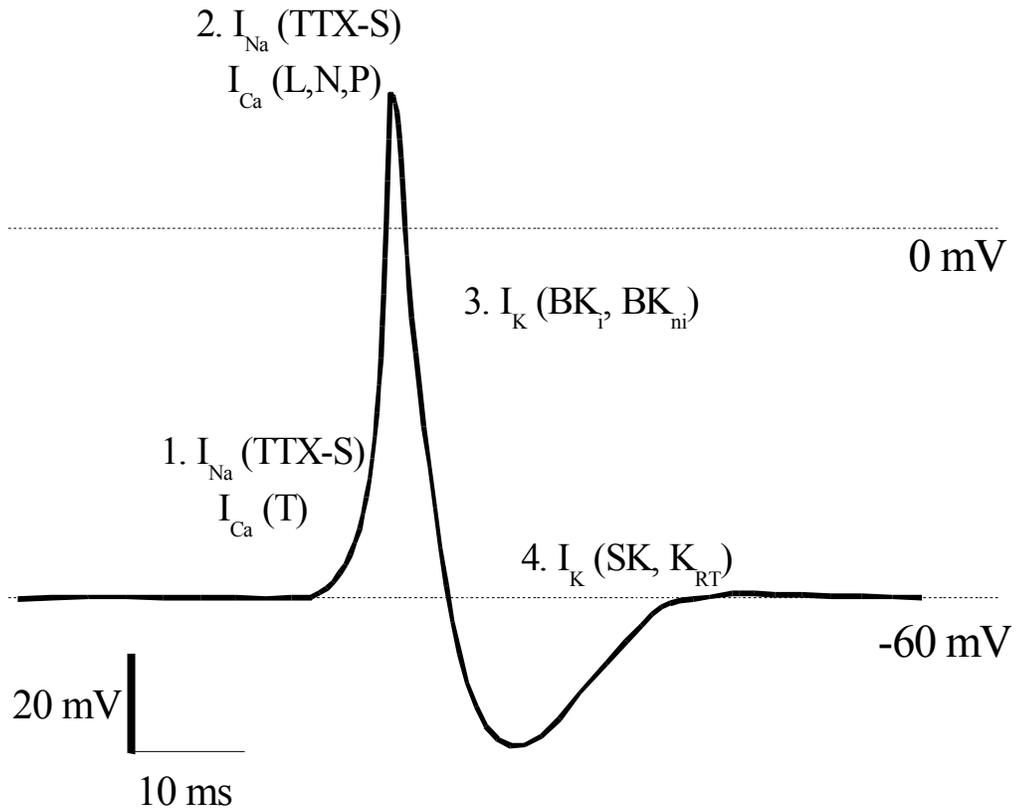


Figura 1. Fases del potencial de acción. Entre paréntesis junto a cada fase se muestran las corrientes que se activan durante ella en las células cromafines.

4) La fase final se conoce como hiperpolarización tardía y depende en parte de los canales de potasio activados por calcio tipo BK ($K_d=0.1 \mu\text{M} - 10\mu\text{M}$), y también en parte de los canales SK. Los canales SK son más sensibles al calcio en condiciones basales ($K_d=0.63 \mu\text{M}$, Park YB, 1994) que los canales

BK, y son prácticamente insensibles al potencial de membrana (Conley EC, 1996) y por ellos su actividad es importante principalmente en la determinación del potencial de reposo de la membrana y por lo tanto del umbral de disparo. Los canales tipo BK en cambio, son sensibles a la concentración del calcio y a la depolarización de la membrana, así que se activan después de la entrada de calcio y la depolarización ocurridas desde la segunda fase del potencial de acción. El aumento de la conductancia del K ocasionado por la apertura de los canales BK contrarresta la depolarización producida en la fase 3 y ocasiona la hiperpolarización observada en esta fase.

La tabla II, muestra un resumen de las características de las corrientes mencionadas junto a cada fase en la figura 1. Otras corrientes identificadas en células cromafines de rata incluyen: I_{IRK} (Artalejo AR, 1997), K_{ATP} (Thompson, RJ y Nurse CA, 1998), SOC, corriente activada por vaciamiento de reservorios intracelulares o 'store-operated current'; Fomina AF, Nowycky MC, 1999), ERG (Gullo F, et al., 2003) y una corriente catiónica no selectiva activada en respuesta a un aumento en la pCO_2 (Muñoz AM, et al., 2005).

Tabla II. Corrientes de membrana presentes en las células cromafines de rata.

Ion	Tipo	γ_{unit} (pS)	% I_{total}	V_{ACT} (pS)	Inactivación
Ca^{2+}	L	20-27 ³	~50% ¹	-30 mV ³	Muy Lenta
	P	10-12 ³	? ¹	-50 mV ^{3,4}	Lenta ^{3,4}
	N	20-27 ³	30-40% ¹	-30 mV ³	Moderada ³
	T	8-10 ¹²	~100%/44% ^{# 2} ~40%/10%	-50 mV ²	Rápida ²
Na^+	TTX-S	10 ⁷	100%	-45mV ^{5,6}	Rápida ^{5,6}
K^+	I_{RT}^*	?	~40% ^{†8}	-30 mV ⁶	Muy Lenta ⁸
	BK _i	~270 ¹⁰	~60% ^{†8} /~75%	-30 mV ⁸	Moderada ¹⁰
	BK _{NI}	~270 ¹⁰	~60% ^{†8} /~25% ⁹	-30 mV ⁸	Muy Lenta ¹⁰
	SK	3-5 pS ¹¹	?	?	?

Notas: *Ion*: Principal ion permeante en condiciones fisiológicas, γ_{unit} : Conductancia de canal único, % I_{total} : Porcentaje de la corriente iónica total dada por la especie iónica mencionada atribuible a ese tipo de corriente, V_{ACT} : Potencial al que se detecta la activación inicial de la corriente. *TTX-S*: Sensible a TTX (0.1 μ M). * I_{RT} : Rectificador tardío. # El primer porcentaje indica % I_{total} que representan esta corriente, el segundo porcentaje indica la porción de la

población en la que el dato anterior se cumple. En células de rata fetales estas proporciones representan a la contribución de la corriente T en el 54% de las células en las que esta presente, el resto de la corriente se debe a canales N y L. † Porcentajes de corriente durante un pulso de potencial a -10 mV, en presencia de Ca^{2+} extracelular. Referencias: 1. Gandia, et al., 1995; 2. Bournaud R, et al., 2001; 3. Tsien et al., 1991; 4. Llinas et al., 1992; 5. Hollins e Ikeda, 1996; 6. Ver Resultados; 7. Fenwick E, et al., 1982; 8. Marty y Neher, 1985. 10. Solaro y Lingle, 1992. 11. Park YB, 1994.

Antecedentes

Actividad espontánea y respuesta a la estimulación de receptores a secretagogos

Se estima que entre el 65 y el 85% de las células cromafines de rata adulta y el ~50% de las de ratón disparan potenciales de acción de manera espontánea, tanto en la glándula intacta, como *in vitro* (Micheletti M, et al., 2005, D'Andrea P, et al., 1996, Nassar-Gentina V, et al., 1988). Las células cromafines de ambas especies disparan potenciales de acción de forma continua y arrítmica con una frecuencia que va de 0.05 a 0.1 s⁻¹ en rata y se centra alrededor de los 6 Hz en ratón (Brandt BL, et al., 1976).

El disparo espontáneo de PA's no es el único tipo de actividad espontánea que demuestran las células cromafines, 65 a 87% del total exhiben cambios oscilatorios en la [Ca²⁺]_i (Malgaroli A, et al., 1990, Micheletti M, et al., 2005). En otros tipos celulares, estos dos tipos de actividad están íntimamente relacionados. Por ejemplo, los gonadotropos de la pituitaria exhiben oscilaciones de calcio cuya dinámica esta gobernada claramente por la dinámica de las conductancias de membrana. Los potenciales de acción disparados en respuesta a la estimulación con GnRH ocasionan la entrada de calcio a través de Ca_v's lo cual ocasiona aumentos periódicos en la [Ca²⁺]_i; (Corrette, et al. 1995).

En células cromafines de rata y ratón la relación entre la actividad eléctrica y la generación de las oscilaciones de calcio es menos clara. No así en las células de bovino, en donde es claro que ambos tipos de actividad se regulan de forma independiente.

Es poco probable que las células de rata se parezcan a las de bovino en este aspecto debido a las cruciales diferencias entre hay ellas. En primer lugar, tanto el disparo espontáneo de PA's como las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ están ausentes en células bovinas (Burgoyne RD, et al., 1989). En segundo lugar, las células bovinas responden pobremente a los agonistas muscarínicos, los cuales, en células de rata, frecuentemente estimulan la generación de oscilaciones de Ca^{2+} (Kim KT, et al., 1989, Finnegan, et al., 1996).

La aplicación de agonistas a mAChR o los receptores de bradicinina (B1) o histamina (H1) presentes en la membrana de estas células determina aumentos de la frecuencia de disparo en células espontáneamente activas y el disparo de potenciales de acción en células previamente inactivas. En ambos casos se producen también oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$. El aumento en la frecuencia de disparo se debe a la despolarización ocasionada por la activación de conductancias de membrana reguladas por los mAChR, B1 o H1. Las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ se atribuyen a la liberación de calcio de pozas intracelulares provocada por los agonistas. De forma similar a su efecto sobre la frecuencia de disparo, la activación de mAChR, B1 o H1 provoca el inicio de oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células inactivas e incrementa la frecuencia de oscilación en aquellas que presentaban oscilaciones espontáneamente. En

algunos casos también se presenta un incremento sostenido en la $[Ca^{2+}]_i$. Estas oscilaciones del Ca^{2+} se distinguen del tipo de oscilaciones provocadas por el disparo de trenes de potenciales de acción en gonadotropos por su curso temporal lento ($\phi \sim 100$ s).

Respuestas a agonistas a los receptores metabotrópicos

Las vías de señalización que controlan la dinámica del Ca^{2+} en células cromafines no se han caracterizado exhaustivamente. Se sabe que los reservorios intracelulares de Ca^{2+} participan en la generación de oscilaciones provocadas por agonistas, sin embargo el mecanismo responsable de las mismas no se ha definido completamente. Los primeros reportes señalan que los reservorios acoplados a los canales de liberación intracelular sensibles al inositol trifosfato, también conocidos como Receptores de $InsP_3$ ($InsP_3R$) estaban involucrados. Estos canales intracelulares se activan al entrar en contacto con inositol-1,4,5-trisfosfato (IP_3) liberado a partir de la hidrólisis del fosfoinosítido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (Alberts, et al., 2002) que la enzima fosfolipasa C rompe para generar diacilglicerol e $InsP_3$ cuando es activada por $G\alpha$, la proteína que traduce la señal de los receptores muscarínicos, ya sean estos receptores a bradicinina o a histamina. En ese primer estudio Malgaroli y colaboradores (1990) afirmaban que la entrada de Ca^{2+} por canales de membrana no era importante para la generación de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ a pesar de que estas últimas desaparecen en ausencia

de calcio extracelular. En su preparación, los bloqueadores de canales de calcio Ni^{2+} , Cd^{2+} (50-100 μM) y nitrendipina (0.5-10 μM), el bloqueador de Na_v 's TTX (1 μM) y la solución externa libre de Na^+ aplicados al medio externo no afectaron a las oscilaciones de calcio.

El pre-tratamiento con neomicina, un inhibidor de la síntesis del InsP_3 , bloqueó las oscilaciones de calcio provocadas por Bc, pero no las oscilaciones espontáneas. Más tarde, se propuso que los receptores a ryanodina (RyR) eran los responsables de la generación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en vista de que la cafeína y la ryanodina, ambos agonistas del RyR (Ryanodina; Rosseau, 1987), fueron los únicos agonistas capaces de generar oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que, al igual que las oscilaciones espontáneas, no fueron bloqueadas por ninguno de los tratamientos anteriormente mencionados.

El siguiente estudio de estos autores (Margaroli y Meldolesi, 1991) puso en duda los resultados anteriores al demostrar que la despolarización inducida por alto $[\text{K}^+]$ (KCl 5 mM) aumenta la frecuencia de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, adicionalmente confirmaron que (1) las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por Bc son dependientes de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$, ya que el vaciamiento de los reservorios por exposición a un medio sin calcio previo a la aplicación del agonista impide la generación de oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a Bc; (2) la introducción del agente quelante del Ca^{2+} derivado del BAPTA-AM (50 μM) ocasiona la pérdida de las oscilaciones; (3) las células que oscilan secretan más que aquellas que no oscilan.

En suma, estos resultados sugieren que la entrada del Ca^{2+} a través de la membrana es necesaria para la generación de oscilaciones inducidas y espontáneas. Una hipótesis sería que ésta es necesaria para abastecer a los reservorios de calcio y ejerce su influencia a través de aportar Ca^{2+} desde el exterior.

El papel de la entrada del Ca^{2+} a través de la membrana adquirió más relevancia cuando se demostró que la aplicación de KCl 3 mM induce a células previamente inactivas a oscilar. Mejoras en la técnica de registro y aplicación de drogas permitieron revelar que tanto el bloqueo de los Na_v 's (TTX 1 μM ; D'Andrea 1994) como el de los Ca_v 's (Nitrendipina 1 μM ; D'Andrea 1993) inhibe sustancialmente o termina las oscilaciones de calcio.

Por otro lado, el papel central del InsP_3R en la generación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se confirmó al demostrarse que la heparina, un inhibidor competitivo del InsP_3 , es capaz de bloquear tanto las oscilaciones espontáneas como las inducidas por Bc. Los RyRs fueron relegados a un segundo plano cuando se demostró que, a diferencia de lo descrito anteriormente (Malgaroli, et al., 1990), la aplicación de ryanodina (10 μM) no cambia la frecuencia ni la forma de las oscilaciones, ni suprime las oscilaciones iniciadas por la aplicación de Bc en la mayoría de las células. Las oscilaciones, ya sean inducidas o espontáneas, son bloqueadas solo en casos aislados, en los que la ryanodina suscita una salida de calcio suficiente para mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ permanentemente elevada. Esto lleva a concluir que los efectos de la

ryanodina y cafeína sobre el patrón de oscilación pueden explicarse por aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ que son capaces de provocar los RyRs (D'Andrea 1993).

D'Andrea en 1993, propuso que existe en los reservorios de calcio un oscilador “marcapaso” dependiente de $InsP_3R$ cuya actividad se mantiene constantemente en regiones limitadas del retículo tanto en células oscilantes como en células inactivas. En su modelo, las oscilaciones de calcio son provocadas por la amplificación de las oscilaciones generadas en el oscilador.

En apoyo a la idea de que un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ podía permitir la extensión de las oscilaciones iniciadas por el oscilador de retículo mediante un mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio, CICR ('Calcium Induced Calcium Release') se demostró que la aplicación de tratamientos que incrementan la entrada de calcio a través de la membrana (p. ej. el aumento de la despolarización de membrana ocasionada por el bloqueo de canales de K^+ por TEA 5 mM, o de canales de K^+ activados por calcio SK por Apamina 1 μM , y el aumento de la entrada de calcio a través de los Ca_v 's; con Bay K 8644 0.5 μM , en fase con las oscilaciones de calcio ya existentes resulta en el incremento de la amplitud de las oscilaciones sin aumentar su frecuencia (D'Andrea 1994).

Estos efectos son antagonizados por la aplicación de dosis bajas de tapsigargina (Tg, inhibidor específico de la ATPasa que bombea calcio al retículo endoplásmico sarcoplasmático). La Tg también bloquea la generación de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ cuando se aplica a mayores concentraciones ($> 0.1 \mu M$), al impedir el reabastecimiento de los reservorios (D'Andrea 1993). El efecto de la

Tg es, en resumen, disminuir el número de reservorios reclutados por el oscilador de calcio interno.

En resumen, las oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ dependen de la entrada de calcio a través de la membrana plasmática y desaparecen después de entradas excesivas de calcio.

Relación entre la dinámica del calcio intracelular y la actividad eléctrica de la membrana

Marengo y Monck (2000), trabajando en células cromafines demostraron que las despolarizaciones breves de la membrana, como los potenciales de acción, originan a cambios rápidos y pronunciados de la $[Ca^{2+}]_i$; en tanto que una despolarización transitoria (0 mV) de 40 ms de duración, -similar a la producida por un tren de potenciales de acción- ocasiona la formación de un gradiente de concentración de calcio a partir de la membrana que se extiende hasta el núcleo celular y se disipa en centenas de milisegundos ($\tau_1 = \sim 7.6$ ms, $\tau_2 = \sim 155$ ms), lo que imposibilita su detección con los sistemas de medición de $[Ca^{2+}]_i$ empleados en la mayor parte de los estudios de dinámica del calcio en células cromafines realizados, los cuales emplean velocidades de muestreo de ~ 0.5 Hz (Malgaroli 1990, D'Andrea 1993), lo que permite suponer que ciertos tipos de movilización rápida de calcio pueden haber pasado desapercibidos. En efecto, este parece ser el caso, pues recientemente se identificaron oscilaciones de calcio rápidas y de menor amplitud (0.3 Hz ~ 200 nM) que las descritas previamente (0.015 Hz,

~700 nM). Estas oscilaciones dependen de la generación de trenes de PA's (Micheletti, et al., 2005) y se distinguen de las descritas anteriormente en que: (1) al igual que los transitorios de calcio producidos por un PA o por un tren de PAs (Marengo y Monck 1999), las oscilaciones rápidas de calcio no se afectan por bloqueadores de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (CPA 20 μM). (2) los agonistas de canales de calcio, como el BK8644, no las afectan ni pueden inducir las (3) la fijación del voltaje de membrana a potenciales cercanos al potencial de reposo (-50 mV) impide su generación (4). Oscilaciones rápidas de calcio idénticas a las observadas espontáneamente pueden generarse cuando los PA's registrados en otras células se usan como voltaje comando. Esto indica que la excitabilidad de la membrana, además de permitir el reabastecimiento de los reservorios de calcio e influir indirectamente sobre la amplitud de las oscilaciones de calcio al incrementar el calcio libre citoplásmico es capaz de generar por si misma aumentos significativos del calcio intracelular.

Generación de actividad eléctrica espontánea

Aunque las conductancias que permiten el disparo de potenciales de acción en células cromafines se conocen desde hace tiempo, los mecanismos que permiten la generación continua de potenciales de acción no han sido estudiados en detalle. Los mecanismos que permiten la actividad eléctrica espontánea, es decir el disparo continuo de potenciales de acción en ausencia de estímulos externos se han caracterizado en algunos tipos de neuronas

(Haüsser, et al, 2004). La actividad espontánea en neuronas se refiere al disparo de potenciales de acción en ausencia de estimulación sináptica, la cual en la mayoría de las neuronas se suma para provocar una despolarización de suficiente magnitud para alcanzar el nivel de disparo de los potenciales de acción. La actividad espontánea en neuronas depende de una interacción entre las corrientes intrínsecas de la célula la cual permite que ésta se despolarize más allá del umbral de disparo, inicie un potencial de acción y regrese a valores cercanos al potencial de reposo, para volver a despolarizarse de nuevo y comenzar de nuevo el ciclo. Diversos estudios han identificado a las corrientes responsables de la despolarización inicial que lleva a la célula a alcanzar el umbral de disparo. En algunos casos, esta despolarización depende de la activación de canales activados por la voltaje, como los Ca_v 's de bajo umbral (canales de calcio de tipo T; McCormick y Huguenard, 1992). En algunas neuronas, las corrientes acarreadas por Na_v 's o por conductancias catiónicas no selectivas son las encargadas de despolarizar el potencial de membrana hasta el umbral de disparo (Raman et al., 2000; Taddese and Bean, 2002; Do y Bean, 2003; Jackson et al., 2004). Neuronas como las células de Purkinje del cerebelo, son capaces de disparar espontáneamente a alta frecuencia (~40-50 Hz) gracias que poseen un componente de corriente de sodio residual que se activa al terminar la fase de repolarización del potencial de acción, proporcionando a la célula la corriente entrante necesaria para alcanzar el umbral y disparar el siguiente potencial de acción. Esta conductancia residual de Na es acarreada por los mismos canales rápidos de sodio sensibles a TTX que, en otras

neuronas, se inactivan completamente al final del periodo de repolarización. La corriente “resurgente” que presentan estas células, es consecuencia de la actividad de una proteína endógena que actúa como un bloqueador del poro abierto, compite con la compuerta de inactivación del canal, interactuando con el poro para bloquearlo durante la fase de despolarización del potencial de acción para después disociarse cuando la célula se despolariza, permitiendo que los canales se abran brevemente.

La actividad eléctrica espontánea de las células cromafines fetales

Las células cromafines aisladas de fetos de rata de 18 DIU presentan oscilaciones espontáneas la $[Ca^{2+}]_i$ (A. Hernández, comunicación personal). Este tipo de actividad no es el único rasgo enigmático de las células cromafines fetales. Un examen detallado revela que estas células ya poseen componentes clave de la maquinaria de secreción de hormonas. Es probable que en muchas de las células, esta maquinaria sea funcional ya que se han reportado, bajo microscopio electrónico, la presencia de ‘formas omega’ (equivalente morfológico del evento de exocitosis) desde el día embrionario 14. Además, se ha detectado *in vivo* durante la gestación la secreción de catecolaminas (Jensen A, 1996). Estos eventos de secreción son relativamente sorprendentes, puesto que ocurren antes del inicio de la innervación de la glándula y de la aparición de los nAChR's, lo cual ocurre hacia el día gestacional 18-20 y de los mAChR's que aparecen a partir del día postnatal 2-3 (Oomori, et al., 1998). Es posible

entonces, que las oscilaciones de calcio sean una manifestación de un mecanismo que permite a las células secretar catecolaminas durante la gestación.

Papel de la secreción de catecolaminas en la respuesta fetal a la hipoxia

Durante la gestación, la pO_2 en la sangre fetal puede decaer a consecuencia de las contracciones uterinas espontáneas que ocasionan una reducción del flujo sanguíneo fetal y de la presión arterial. En la etapa terminal de la gestación, la respuesta del sistema cardiovascular a la hipoxia aguda esta mediada por la acción de los baroreceptores del cuerpo carotídeo. Sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo gestacional, el reflejo de los baroreceptores aún no esta presente y el sistema simpático inmaduro, no es capaz de regular la constricción de las arterias para incrementar la presión arterial. Por lo tanto la respuesta a la hipoxia sistémica depende de la actividad secretora de la células cromafines (Jensen A, 1996). En la oveja, las células cromafines son capaces de aumentar la secreción de CA's sin ser activadas por el sistema simpático. La despolarización que promueve la secreción de catecolaminas depende, del cierre de conductancias al K^+ sensibles a la hipoxia. En células cromafines de ratas neonatales también se ha descrito la presencia de conductancias de K^+ que se cierran en respuesta a la caída de la pO_2 (Thompson, et al., 1998, Mochizuki-Oda, et al., 1997, Takeuchi, et al., 2001), además de la presencia de

una conductancia catiónica no selectiva sensible a la $p\text{CO}_2$ (Muñoz AM, et al., 2005). En respuesta a la hipoxia, la concentración de CA's en sangre aumenta drásticamente, lo cual ocasiona la redistribución de la sangre hacia el corazón y el cerebro y un aumento en la frecuencia cardíaca. Esta respuesta se origina de las células cromafines inmaduras del feto (se desconoce si todas las poblaciones de cromafines participan, la respuesta, ya que las catecolaminas secretadas pueden provenir de las células cromafines de la médula adrenal como de los grupos celulares cromafines que se derivan de los mismos precursores y que desaparecen después del nacimiento). Al menos en el ratón, se ha demostrado que esta respuesta homeostática es esencial para la sobrevivencia durante la gestación. El 90% de los fetos de ratón incapaces de producir CA's mueren antes del día 15.5 de la gestación (Zhou QY, et al., 1995). Estos animales no sintetizan CA's debido a que carecen de los dos alelos del gen que codifica para la enzima tirosina hidroxilasa (TH). La muerte fetal ocurre a causa de una congestión cardíaca aguda, a menos que las madres reciban un suplemento de L-DOPA, precursor de las CA's, durante la gestación. Al igual que los animales TH⁻, los animales normales a los que se les administra un bloqueador genérico de los receptores β -adrenérgicos a los que se une la adrenalina, mueren a causa de una falla cardíaca cuando son sometidos a hipoxia *in vitro* (Jensen A, 1996, Portbury, et al., 2003).

Justificación del Proyecto

Los mecanismos que controlan de la secreción de catecolaminas se han estudiado en células cromafines aisladas de animales jóvenes y adultos. La secreción de estas células incluye un componente significativo de la secreción que se debe a la liberación de CA's ocasionada por oscilaciones espontáneas de calcio. La mayoría de los estudios realizados hasta ahora se han enfocado a estudiar las oscilaciones de calcio suponiendo que el conocimientos acerca del origen de la actividad eléctrica en otros tipos celulares o situaciones experimentales se aplican exactamente. Nosotros proponemos que es preciso estudiar a profundidad el origen de a la actividad eléctrica y entender cuales son las consecuencias de su manipulación antes de tratar de extender las diversas maniobras experimentales al estudio de las oscilaciones de calcio y la secreción. Por otro lado, es posible que en las células cromafines inmaduras que son objeto de nuestro estudio, la actividad eléctrica también contribuya a la generación de oscilaciones de calcio intracelular y la secreción de catecolaminas. Para entender el origen de las oscilaciones es necesario estudiar los mecanismos que permiten su generación. El presente estudio buscamos caracterizar el patrón de la actividad de eléctrica en dos puntos del desarrollo de las células cromafines (fetal y neonatal) y examinar, en estos dos estadios, los mecanismos que permiten la generación espontánea de potenciales de acción.

Hipótesis

La actividad eléctrica espontánea de las células cromafines inmaduras, resulta de la interacción entre sus conductancias intrínsecas de la membrana. Estas conductancias pueden o no ser iguales en los dos estadios que se comparan en este trabajo

Objetivo General

Caracterizar el patrón de disparo espontáneo de las células cromafines fetales y neonatales, y estudiar la participación de los canales responsables de las conductancias involucradas en la generación del potencial de acción en células cromafines examinando los efectos de inhibidores específicos de estas conductancias, sobre dicha actividad eléctrica espontánea.

Objetivos Particulares

- a) Cuantificar la frecuencia de disparo basal de las células cromafines fetales y neonatales bajo condiciones de cultivo estándar y determinar si existen diferencias en la frecuencia de la actividad espontánea en estos dos puntos de desarrollo.

- b) Determinar que si la generación espontánea de potenciales de acción depende de la actividad de los canales de sodio voltaje dependientes en células cromafines fetales (17-18 DIU) y neonatales (2-3 DPP) de rata mediante el uso de inhibidores específicos como la Tetrodotoxina y la Vinpocetina.

- c) Determinar si la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje, y en general la entrada de calcio a través de la membrana es necesaria para la generación de la actividad espontánea.

Metodología

Animales

Todos los animales utilizados en este trabajo fueron obtenidos de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde fueron mantenidos de acuerdo a lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana (NOM062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Cultivo celular

Todos los cultivos fueron preparados por la Biol. Diana Millán, del Departamento de Neurociencias del IFC. Para la obtención de células cromafines fetales, las ratas embarazadas fueron sacrificadas por dislocación cervical en el día 18 de gestación. Los úteros fueron colectados y lavados con medio Hank's ('Hank's Balanced Salt Solution' o HBSS). Los fetos fueron separados del útero junto con su saco amniótico y se colocaron bajo el microscopio estereoscópico para disecar las glándulas adrenales. Para la obtención de células neonatales, los neonatos de una camada se separaron de la madre en el día postnatal 3. Los neonatos se anestesiaron por hipotermia antes de disecar las glándulas adrenales en la misma manera que se hizo para la obtención de células fetales. Las glándulas disecadas fueron mantenidas en

medio HBSS frío. Después de terminada la fase de colección, las glándulas fueron lavadas cuatro veces con HBSS frío y digeridas enzimáticamente por incubación con Colagenasa tipo I (Worthington, Inc., Lakewood, Nueva Jersey, EUA) y DNAasa, disueltas el HBSS usado para suspender a las glándulas a una concentración de 1mg/ml y 1.5 mg/ml, respectivamente. Esta preparación se agita constantemente durante 45 minutos en una incubadora a 37 °C. La digestión se detiene al sustituir el medio por HBSS sin enzimas, las células disociadas fueron colectadas por centrifugación por 10 minutos a 800 r.p.m. El sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Invitrogen Corp., Grand Island New York EUA) acondicionado con 5% de suero fetal bovino. Las células obtenidas se colocaron en gotas sobre una caja Petri de plástico estéril y se incubaron durante 30 min a 37 °C en una incubadora, en presencia de 95% aire y 5% CO₂. La suspensión de células que no se adhirieron al plato de Petri se recuperó del sobrenadante y se centrifugó a 800 r.p.m's. Las células en la pastilla son resuspendidas en medio de cultivo DMEM. La suspensión se sembró en placas de cultivo de 12 pozos (Corning, Inc., Corning, Nueva York, EUA) en cuyo fondo se había colocado previamente un cubreobjetos de vidrio de 35 mm, recubierto con Poli-D-Lysina (Preparados por incubación del vidrio en una solución 0.1 mg/ml de PDL, 8 h a 4 °C). Después de que se observó que la mayoría de las células se han adherido al fondo del cubreobjetos, se agregó 1 ml de DMEM a cada cubreobjetos y la placa se colocó en una incubadora húmeda en una atmósfera compuesta de 95% aire y 5% CO₂. Las cultivos así obtenidos fueron

empleados para registro desde las 12 horas y hasta 48 horas después de su siembra en la mayoría de los casos. Bajo el microscopio, las células cromafines pueden ser distinguidas fácilmente de las células de la corteza de la glándula adrenal debido a que son de menor tamaño (diámetro 10-15 μM vs. 25-35 μM) y a que su citoplasma tiene un aspecto uniforme pues carecen de las vesículas de lípidos que dan una apariencia granular al citoplasma de las células de la corteza.

Preparación de soluciones

Solución Interna para registro de corrientes de Ca^{2+} y Na^+

Compuesto	Concentración (mM)
Metanosulfonato de Cesio	115
Cloruro de Cesio	15
BAPTA-Tetracesio	2
ATP Magnesio	4
GTP Magnesio	0.5
Fosfocreatina	10
HEPES	5

Solución interna para registro de corriente de Na^+

Compuesto	Concentración (mM)
Metanosulfonato de Cesio	115

Cloruro de Cesio	15
BAPTA-Tetracesio	2
ATP Magnesio	4
HEPES-Na	5

Notas de preparación: El pH fue ajustado a 7.3, la osmolaridad fue ajustada a 280 mOsm, usando un osmómetro de punto de vapor Wescor (Wescor; Logan, Utah, EUA). Las soluciones fueron mantenidas en congelación (-20 °C) hasta el momento de su empleo. La elección de Cs⁺ como ión principal de la solución interna en vez de K⁺, se debe el Cs⁺ es bloquea selectivamente a los canales de K⁺ cuando es aplicado intracelularmente, lo cual permite registrar las corrientes de Na⁺ y Ca²⁺ en aislamiento.

Solución externa

Compuesto	Concentración (mM)
Cloruro de Sodio*	145
Cloruro de Potasio*	3
Cloruro de Calcio*	2
Cloruro de Magnesio*	2
Glucosa	5
HEPES	10
Bicarbonato de Sodio*	1
Fosfato monobasico de Sodio*	0.5

pH ajustado a 7.35 con NaOH. Osmolaridad fue ajustada a 290 mOsm con NaCl.

Preparación de drogas

Las drogas empleadas fueron diluidas en solución extracelular al momento de su empleo a las siguientes concentraciones: Tetrodotoxina (TTX) 0.5 μM y 10 μM , Caribdotoxina (CbTx) 100 nM, Nifedipina (NIF) 5 μM , Mibefradil (MIB) 10 μM . TTX, MIB y CbTx fueron preparadas a partir de alícuotas de soluciones concentradas (1mM, 100 μM y 10 mM, respectivamente) mantenidas en congelación (-20 °C) desde el momento de su preparación. Las soluciones de Nifedipina fueron preparadas el día de su empleo, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Los reactivos marcados con (*) fueron adquiridos de J.T. Baker; Xalostoc, Edo. de Mexico, Mexico. Todos los reactivos cuyo proveedor no se indica a continuación de su nombre fueron adquiridos de Sigma Chemical, St. Lois Missouri, EUA. Todas las soluciones empleadas fueron preparadas usando agua desionizada (NanoPURE, Barnstead International, Dubuque, Iowa, EUA). Las soluciones de registro fueron filtradas con un filtro tipo GS de 0.22 μM (Milipore Corporation, Billerica, Massachusetts, EUA). Cuando no estaba en uso, la solución externa se mantuvo 4 °C y se descartó si había sido preparada más de seis días antes.

Registro electrofisiológico: Técnica de fijación de voltaje

Para el registro de corrientes macroscópicas de membrana en células cromafines de de mamífero se empleó la técnica de fijación de voltaje en configuración de “célula entera” o ‘whole-cell patch-clamp’ (Hamill, et al., 1980). La célula puede ser representada eléctricamente por un circuito compuesto de un elemento capacitivo (Figura 2, C_m) conectado en paralelo con una resistencia que representa la suma de las conductancias activas y pasivas presentes en la célula (Figura 2, R_m). El flujo de corriente a través de la membrana celular ocurre a través de estos dos elementos y puede ser controlado al inyectar corriente mediante un solo electrodo. Las corrientes que atraviesan la membrana de la célula son llevadas a un amplificador operacional, representado por OpA en la figura 2, a través de la resistencia del electrodo. La medición precisa de R_m depende de que la resistencia del sello (R_s) sea alta, de modo que la mayor parte de la corriente fluya a través de R_m . El amplificador simultáneamente realiza la medición de la corriente de membrana y la fijación de voltaje del interior celular.

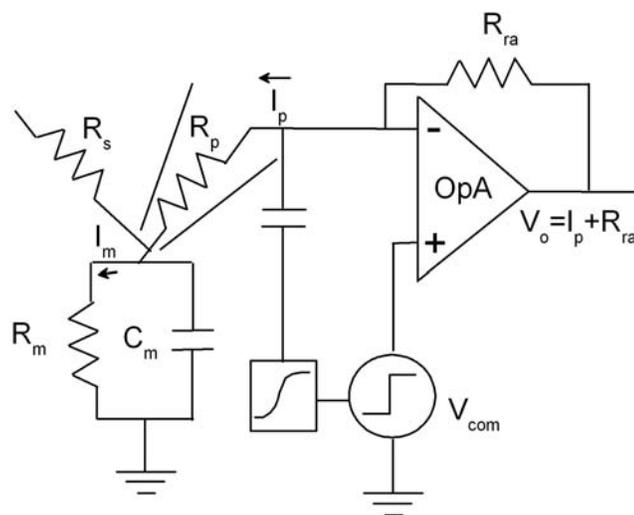


Figura 2. Representación Esquemática del proceso de fijación de voltaje.

Como se muestra en la figura 2A, el amplificador está en configuración de transductor corriente a voltaje, la salida del amplificador (V_o) es proporcional a la corriente total de membrana (I_m) más el voltaje de "comando" (V_{com}) conectado a la terminal positiva del amplificador. El voltaje entre las terminales positiva y la negativa del amplificador es insignificante. La terminal negativa en el estado estacionario sigue por lo tanto al voltaje comando impuesto sobre la terminal positiva por el generador de pulsos. La terminal negativa está conectada directamente con el interior celular, por tanto, el voltaje de membrana es muy cercano al voltaje de la terminal negativa cuando la resistencia de la pipeta es baja. Después de un cambio súbito en el potencial, tal como el que ocurre después de la aplicación de un pulso de voltaje, la corriente de membrana I_m es proporcional al producto de la capacitancia de membrana C_m por la derivada del voltaje, dV/dt . La corriente que carga la capacitancia de membrana durante la aplicación de un pulso cuadrado de potencial se alimenta a la pipeta desde la salida del amplificador a través del resistor de retroalimentación (R_{ra}). Un resistor de alta resistencia en este punto limitaría la corriente y retardaría el establecimiento de la fijación de voltaje, por lo tanto se emplean resistores de baja resistencia. Además, para asegurar el establecimiento de la fijación, un circuito extra, que se esquematiza como un cuadrado, alimenta la corriente de carga de la capacitancia a través de un capacitor. Cuando está ajustado idealmente, solo el componente de voltaje comando aparece en la salida durante la aplicación del pulso cuadrado y el componente de corriente es cero dado que

toda la corriente de carga está dada través del capacitor de entrada y ninguna pasa la resistencia de retroalimentación (Sherman-Gold, 1993).

Registro electrofisiológico de corrientes de Na⁺ y Ca²⁺

Los cubreobjetos con el cultivo de células cromafines fueron colocados en el fondo de una cámara de registro desmontable acoplada a la platina de un microscopio invertido Diaphot 2 (Nikon Corp., Tokio, Japon). Durante la sesión de registro la cámara se mantuvo en perfusión constante (~2.5 ml/min) con solución externa equilibrada a temperatura ambiente (21 a 23°C). Las células a registrar fueron identificadas por inspección visual usando una magnificación de 100X NPL Fluotar (Leica Microsystems AG; Wetzlar, Alemania) y monitoreadas constantemente durante el registro mediante una cámara CCD (Cohu, Inc., Tokio, Japon) acoplada al puerto lateral del microscopio. Las pipetas de registro fueron elaboradas mediante el uso de un estirador de vidrio o 'puller' electromecánico Narishige PP-83 (Narishige Scientific Instruments; Tokio, Japon) usando capilares de borosilicato de diámetro de 1.2 mm y diámetro interno de 0.69 milímetros (Warner Instrument Corp., Hamden, Connecticut, EUA). Para el registro de corrientes transmembranales mediante el método de fijación de voltaje, las pipetas fueron llenadas con solución interna filtrada. Una vez llena la pipeta con solución, se inserta en ella un alambre de plata recubierto con AgCl que se encuentra conectado a la cabeza del preamplificador y el amplificador (Axoclamp 1-D, Axon Instruments, Union City, California, EUA). La

pipeta se introduce en la cámara de registro el amplificador se pasa a modo fijación de voltaje. Las pipetas fueron usadas para registro si exhibían una resistencia de entre 2 y 4 M Ω . La pipeta de registro fue posicionada delicadamente encima de la membrana de la célula empleando un micromanipulador piezoeléctrico Burleigh PZ-301 (Burleigh Instruments Inc., Fishers Nueva Jersey, EUA) mientras se aplicaba suficiente presión positiva para observar una ligera deflexión en la membrana de la célula al acercarse la pipeta. En esta condición, se retira la presión positiva, la pipeta se acerca a la célula hasta observar la deflexión de su membrana y se aplica un voltaje negativo de -20 mV a la pipeta para facilitar el sello. En este punto se aplica presión negativa hasta conseguir el establecimiento de un sello de alta resistencia (1-3 G Ω). Para establecer la configuración de célula completa ('whole-cell patch clamp') se aplicó presión negativa con la boca hasta conseguir el rompimiento de la membrana contenida por la apertura de la pipeta. Antes de romper el sello, se fija el potencial de membrana a -90 mV y después de su apertura se aplican pulsos hiperpolarizantes pequeños, de 5 o 10 mV. Las corrientes obtenidas reflejan la suma de la corriente capacitiva y la resistencia pasiva de la célula. El programa de adquisición empleado (Clampex ver 8.01, Axon Instruments, Union City, California, EUA) permite el ajuste rápido de los trazos de corriente capacitiva a una exponencial para obtener el valor de la capacitancia de membrana mediante el uso de su utilidad "membrane test". La resistencia en serie y la capacitancia fueron compensadas mediante el uso de los circuitos de compensación integrados en el amplificador hasta en un ~70-

90%, su estabilidad durante el tiempo de registro se verificó después de cada adquisición. Las corrientes registradas fueron amplificadas 1x, filtradas a 5 kHz digitalizadas a 100 kHz (Digidata 200AB, Axon Instruments, Union City, California, EUA) y almacenadas en el disco duro de una computadora personal. Para provocar la activación de las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} , se aplicó una serie de pulsos de voltaje cuadrados de 15 ms de duración, iniciando con un pulso a -50 mV y aumentando la despolarización en pasos de 10 mV hasta llegar a los +30 mV. Este protocolo se muestra en forma esquemática en figura 2B, parte superior, acompañado por una serie de trazos representativos del tipo de corrientes de Na^+ y Ca^{2+} obtenidas al aplicar el protocolo (Figura 2B, parte inferior). Cada pulso de prueba del protocolo mostrado en la figura 2B fue antecedido por una serie de cuatro pulsos hiperpolarizantes (Protocolo P/4) a partir del potencial de mantenimiento (-90 mV). La amplitud de estos cuatro pulsos sumada equivale a la amplitud del pulso de prueba aplicado, por lo tanto, la suma de las corrientes pasivas obtenidas en respuesta a los pulsos hiperpolarizantes equivale al valor del componente pasivo de la corriente obtenida durante el pulso de prueba. Este componente es restado del valor de la corriente obtenida durante los pulsos de prueba para aislar a las corrientes debidas a la actividad de los canales iónicos de la contribución debida a la corriente capacitiva y de fuga pasiva.

Registro electrofisiológico de corrientes de acción: Bases del método.

Debido su pequeño tamaño (10 a 15 μM), el registro del potencial transmembranal de las células cromafines utilizando electrodos intracelulares de punta fina empleados para registro de potencial en neuronas y otras células de mayor diámetro resulta poco viable (pero ver Nassar-Gentina V. et al., 1998, quienes lograron registrar células cromafines de ratón en la glándula intacta por medio de esta técnica). Por otro lado, la técnica de “patch clamp” en configuración de célula completa con el amplificador en modo de fijación de corriente ha sido utilizada con éxito para registrar potenciales de acción en células cromafines por algunos grupos (Margaroli A, et al., 1990, D'Andrea P., et al., 1993, Hollins e Ikeda, 1996, Moser T, 1998). Sin embargo, en todos los casos, el establecimiento de la configuración célula completa (ie. la apertura del sello de membrana para que la pipeta entre en contacto con el interior celular), resultó en la pérdida de la actividad espontánea de las células, al introducir al medio interno los amortiguadores de calcio presentes en la solución intrapipeta que son necesarios para mantener dentro de valores aceptables a la concentración de calcio libre en la pipeta (Marengo FD y Mock JR, 2000). Recientemente otros autores (Gullo, et al., 2003, Duan K., et al., 2003, Micheletti M, et al., 2005) han empleado la versión de “parche perforado” (Horn R y Marty A, 1988) de la técnica de patch-clamp para lograr el registro de potenciales de acción sin dializar el interior celular. En estas condiciones, Micheletti M., et al (2005), lograron registrar la actividad espontánea de la membrana en células cromafines.

Sin embargo, dado que en el presente estudio nuestro interés se centraba en obtener mediciones confiables de la frecuencia de disparo de los potenciales de acción más que en conocer el valor exacto del potencial de membrana en todo momento, optamos por utilizar una técnica enteramente no invasiva para el registro de la actividad: a técnica de “patch clamp” en configuración de célula adosada eléctrica. En 1982, Fenwick E., et al. observaron que al emplear la técnica de “patch clamp” en configuración de célula adosada y modo fijación de voltaje, las espigas de corriente resultantes del disparo espontáneo de potenciales de acción podían ser registradas a través del parche de membrana intacto. Cuando el parche se mantiene a un potencial fijo, de la manera descrita por Fenwick E., et al. (1982), los potenciales de acción que ocurren en la célula inducen corrientes de membrana bifásicas a través del parche de membrana. Teniendo a la pipeta como punto de referencia, el primer componente de estas ondas es una espiga de corriente negativa, pues fluye del interior de la célula al interior de la pipeta. El segundo componente es una espiga más pequeña y redondeada que fluye en la dirección opuesta (Figura 3B). Esta misma configuración ha sido empleada (aunque con una resolución temporal menor a la que puede conseguirse mediante las técnicas mencionadas al inicio de esta sección) para el registro (Verheugen et al., 1995 y Verheugen et al., 1999) y la estimación del potencial transmembrana (Mason et al., 2005) tanto en células no excitables como en células excitables.

El potencial de acción induce un cambio de voltaje a través de la resistencia de la pipeta (R_p), la conductancia (γ_m) y la capacitancia (C_m) del

parche. El incremento total en la corriente (Δi) considerando a V igual al incremento total de voltaje durante la fase de subida del potencial de acción está dado por (Barry y Linch, 1989):

$$\Delta i = \frac{V}{R_p} + V \cdot \gamma_m + C_m \cdot \frac{dV}{dt}$$

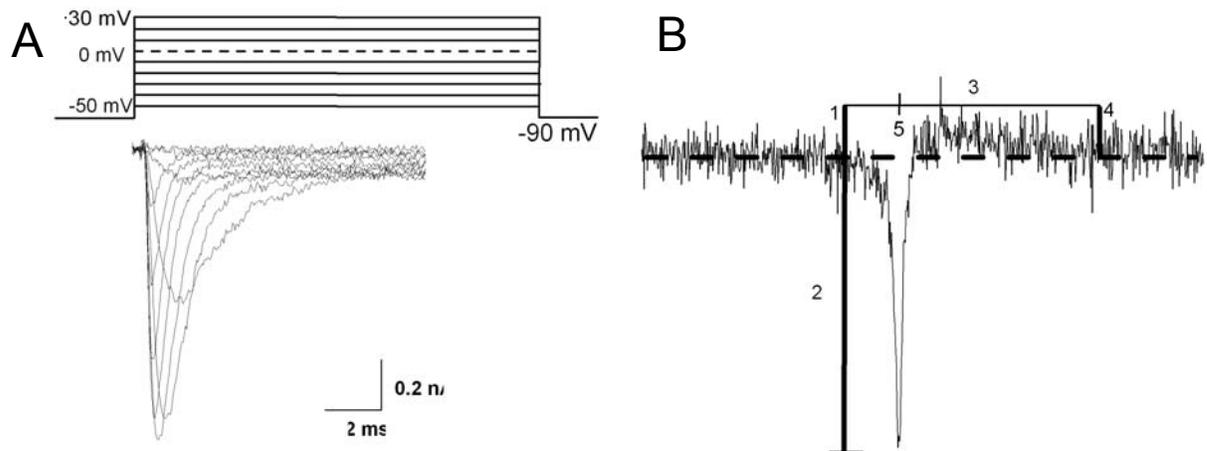


Figura 3. Registro de corrientes en modo fijación de voltaje. A. La parte superior del panel muestra un esquema del protocolo de pulsos de voltaje aplicado, la parte inferior muestra la familia de corrientes de sodio obtenidas en respuesta a estos pulsos, las condiciones del medio extracelular e intracelular están indicadas en la sección de *soluciones*. B. Corriente de acción registrada extracelularmente. El componente negativo se muestra como una deflexión hacia abajo en el trazo y el componente positivo se muestra como una deflexión hacia arriba. Los números indican: 1) inicio del evento, 2) máxima amplitud negativa, 3) máxima amplitud positiva 4) final del evento, 5) tiempo al pico.

Dado que la corriente capacitiva constituye el componente mayor de la corriente,

el efecto neto del parche de membrana es producir la primera derivada del potencial de acción. Así, la variabilidad del registro extracelular puede explicarse porque variaciones pequeñas en la forma del potencial de acción causan variaciones significativas en la amplitud y forma de la corriente registrada a

través del parche. Asimismo, dado que el tamaño y forma de los parches varía dentro de las pipetas, esto se verá reflejado en diferentes valores de C_m y por tanto, en diferentes amplitudes de la corriente. Registros con mayor relación señal-ruido, pueden obtenerse cuando se succiona intencionalmente dentro de la pipeta una mayor cantidad de membrana (Barbour B e Isope P, 2000).

Registro electrofisiológico de corrientes de acción: Procedimiento.

Para el registro de corrientes que resultan de la actividad eléctrica espontánea, las pipetas se llenaron con solución filtrada de composición idéntica a la del medio externo, y fueron empleadas si tenían una resistencia entre 3.5 y 6.5 M Ω . Para establecer un sello de baja resistencia (“loose patch”) la pipeta de registro, cuyo potencial se fija a 0 mV mediante el uso de un amplificador en modo de fijación de voltaje (Axoclamp 1-D), se aproximó lentamente a la célula mientras se monitorea continuamente la resistencia del sello. A medida que la pipeta se aproxima a la superficie de la célula la resistencia de la pipeta aumenta y asimismo aumenta la amplitud de las corrientes de acción registradas. En este momento, se aplicó una muy ligera presión negativa con la boca a la pipeta solo hasta el punto en que la resistencia (R_s) se mantuvo establemente alrededor de los 50 M Ω . Dado que no es necesario establecer un sello de alta resistencia, es posible utilizar la misma pipeta para el registro sucesivo de varias células de forma rutinaria, cambiando la pipeta sólo cuando su resistencia dejaba de estar dentro del intervalo entre 3.5 y 6.5 M Ω . R_s se monitoreó constantemente

durante el registro. Todos aquellos registros en los que R_s varió súbitamente fueron eliminados del análisis. Las corrientes registradas a través del electrodo fueron amplificadas 10x, filtradas a 5 kHz, digitalizadas a 10 kHz y almacenadas en el disco duro de una computadora personal. La adquisición de los datos fue controlada desde la computadora mediante el programa Clampex ver 8.01 en modo de adquisición continua (*gap-free*). Después de la obtención de un sello estable se obtuvo un registro de corriente continuo de dos minutos para determinar la frecuencia de disparo en condiciones basales. En los casos en los que se aplicaron drogas, un segundo registro de dos minutos fue obtenido después de haber aplicado cada droga. Las drogas fueron disueltas en solución externa de composición idéntica a la del resto del medio externo y se llenaba con ella una pipeta de vidrio idéntica a la de registro excepto en el diámetro de la punta ($\sim 2-3 \mu\text{M}$). Esta pipeta se colocó dentro del mismo plano focal que la célula en registro con la punta a $\sim 50 \mu\text{M}$ de distancia de la célula usando un manipulador eléctrico MS314 (Fine Science Tools, Inc., Foster City California, EUA). La eyección de la solución de esta pipeta sobre la célula en registro fue regulada mediante un controlador de pulsos de presión Picospritzer II (General Valve Corp. Jersey, EUA ~ 10 psi). La salida y flujo continuo de solución de la pipeta se verificó visualmente después del inicio de cada pulso al observar la ligera deflexión en la membrana de la célula que acompaña al inicio del pulso de presión.

Análisis de Datos

El análisis de los registros de corrientes de acción consistió básicamente de la extracción de los eventos ocurridos junto con una determinación de su frecuencia (F_d) y el tiempo de su ocurrencia. Debido a que los eventos pertenecientes a una sola célula presentan una forma relativamente constante, la identificación de eventos pudo hacerse de forma automática una vez generado un ejemplo de la forma de la corriente de acción de esa célula. Esta forma ejemplar se generó al promediar una serie de trazos recuperados del registro al extraer todos los segmentos del registro de duración apropiada alrededor de un punto que cruzada el umbral de detección, el cual se fijó de acuerdo al registro en un punto. De esta pre-selección se eliminaron aquellos trazos que correspondían identificados por inspección visual y alineados manualmente, tomando como referencia el punto donde la corriente de cada evento alcanzaba su amplitud máxima. Sólo fue necesario utilizar una selección al azar de 50 eventos para generar una forma que nos permitiera reconocer a todos los eventos del registro con el mismo grado de confiabilidad si se hubiese usado el promedio todos los eventos existentes. Una vez generado el templatado, la utilidad de búsqueda de eventos 'event search' de Clampfit escanea el registro en busca de segmentos que coinciden con la forma ejemplar designada. Los eventos son medidos a partir de la línea basal que se determina con base en la forma ejemplar, de modo que las variaciones ligeras en la línea basal no afectan a la medición pues las amplitudes de los eventos se determinan a partir de esta línea basal local y no a un valor absoluto. El tiempo de inicio del evento

se marcó en base al punto de inicio de coincidencia con el templado. El fin del evento es el punto en que la corriente regresa al valor basal. Los segmentos de registro correspondientes a los eventos identificados fueron almacenados por separado en un archivo. El trazo obtenido al promediar todos los eventos de un registro (alineados al pico de corriente antes de hacer el promedio) se muestra al lado de cada uno de los registros mostrados en la sección de resultados. Para cada evento identificado, se cuantificaron los siguientes parámetros: tiempo de ocurrencia, máxima amplitud, tiempo de ocurrencia de la máxima amplitud, duración del evento y fin del evento. Este procedimiento se llevo a cabo utilizando las funciones incluidas dentro de la utilería de detección de eventos del programa Clampfit version 9.0 (Axon Instruments, Union City, California, EUA). Para facilitar el reconocimiento de eventos con este método, se eliminaron los componentes correspondientes al ruido de alta frecuencia y fluctuaciones lentas del potencial durante el registro mediante el empleo de un filtro digital compuesto de un filtro pasabajos Gaussiano con frecuencia de corte 1000 Hz y un filtro pasa altos Bessel de 8 polos con frecuencia de corte de 1 Hz. Algunos registros se sometieron adicionalmente a un filtro detector de señales sinusoidales para eliminar la interferencia eléctrica de 60 Hz.

Para el caso de los registros de corriente transmembranal, la máxima corriente provocada por cada pulso de voltaje fue determinada y el máximo fue normalizado por la capacitancia de la célula. En el caso de la corriente de sodio, el decaimiento de las corrientes producidas con cada escalón de voltaje fue ajustado a un curso exponencial, de dicho ajuste se obtuvo el parámetro

τ inactivación usando el programa Clampfit versión 8.01. El cálculo de la densidad de corriente y los parámetros de activación, así como el análisis estadístico y la composición de las figuras se realizaron mediante el programa Origin versión 7.0 (OriginLab Corp., Northhampton, Massachusetts, EUA), los datos fueron comparados usando la prueba de análisis de la varianza de una vía, $\alpha=0.01$ ('One-way ANOVA'). Para generar las curvas de activación mostradas en la figura 5D, panel derecho, se calculó primero el valor de la conductancia de sodio (g_{Na}) de acuerdo a la ecuación:

$$g_{(V)} = I (V - E_{Na})$$

Donde $g_{(V)}$ es el valor de g_{Na} durante el pulso de prueba, V es el valor de voltaje del pulso de prueba y E_{Na} es el valor del potencial de reversión de I_{Na} . Este valor se normalizó contra la conductancia máxima para el sodio obtenida en cada registro y se graficó contra el valor del voltaje. Los valores obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Boltzmann:

$$\frac{g}{g_{Max}} = \frac{1}{1 + \exp^{[(V_{1/2} - V)/k]}}$$

Donde g es el valor de g_{Na} durante el pulso de prueba, V es el voltaje del pulso de prueba, g_{Max} es la máxima conductancia obtenida, $V_{1/2}$ es el voltaje al que se la activación de la mitad de la corriente y k es la pendiente de la curva.

Resultados

Las células cromafines neonatales disparan potenciales de acción espontáneamente a una frecuencia mayor que las células fetales

Tanto las células cromafines fetales como las neonatales disparan potenciales de acción de forma continua y sin un patrón definido. La frecuencia de disparo (Fd) se midió durante los dos minutos de registro inmediatos al establecimiento de un sello de resistencia estable. Las células fetales exhiben una menor Fd que las células neonatales, (0.87 ± 0.74 D.E. Hz. (n=43) vs 1.80 ± 1.03 D.E. Hz (n=74) $p < 0.001$, ver figura 4). En nuestros cultivos las células se encontraban, ya sea aisladas unas de otras, o formando parte de cúmulos que comprendían desde dos hasta una veintena de células. Para el caso de las células fetales, el porcentaje de células activas en estas dos condiciones fue diferente. El 64.44% de las células en cúmulos (29 de 45) estaban activas, en tanto que solo 16.6% de las células aisladas (15 de 90), presentaban actividad. Las células aisladas también demostraron una menor frecuencia de disparo promedio que las células en cúmulo, (fetales en cúmulos: 1.093 Hz ± 0.51 DE (n=28), fetales aisladas: 0.37 Hz ± 0.27 D.E. (n=15), $p < 0.00002$). La probabilidad de encontrar células activas entre las células neonatales fue similar a la mostrada para las células fetales en cúmulos (76.9% de células aisladas, (30 de 39), y 77.2% de células en cúmulos (44 de 57). A diferencia de lo observado para las células fetales, no existieron diferencias significativas entre la Fd

promedio de las células neonatales ya sea que éstas se encontrasen aisladas o en cúmulos ($1.68 \text{ Hz} \pm 1.07 \text{ D.E. (n=30)}$ y $1.88 \text{ Hz} \pm 1.01 \text{ D.E. (n=44)}$ $p < 0.406$). No se observó ningún efecto del número de horas en cultivo sobre la probabilidad de encontrar células activas, ni se detectaron cambios sistemáticos en la frecuencia de disparo de las células durante el período examinado (12-48 h de cultivo). Después de 48 h en cultivo la mayor parte de las células se encontraban en cúmulos y éstos por lo general se encontraban recubiertos de una película (posiblemente proteínas de la matriz extracelular), que en la mayoría de los casos imposibilitó la obtención de registros. Es muy probable que estas células continúen presentando actividad eléctrica durante varios días después de esta fecha, dado que las oscilaciones de calcio se pueden seguir registrando hasta 8 días después de la fecha de siembra (Nicolás Jiménez, comunicación personal).

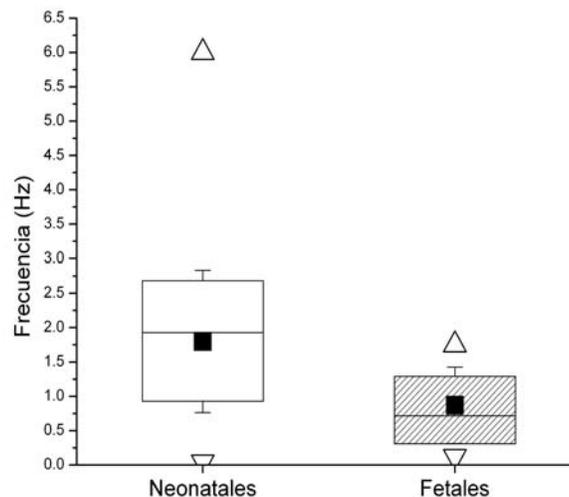


Figura 4. Las células neonatales disparan a una mayor frecuencia que las células neonatales. Cada caja representa a la población de células estudiada. Los triángulos representan a la mayor y la menor frecuencia registradas. El cuadrado negro representa al promedio, las líneas indican el valor de la desviación estándar y la línea que divide la caja es la frontera entre el percentil 25 v el 75.

El bloqueo de la corriente de sodio sensible a TTX no impide el disparo espontáneo de potenciales de acción

La corriente de sodio (I_{Na}) es responsable de lograr la despolarización que lleva al disparo de potenciales de acción en las neuronas y otros tipos celulares. Esta presente en las células cromafines adultas y es necesaria para producir el disparo de sus potenciales de acción. Ya que en algunos tipos celulares estos canales también contribuyen a la generación de descargas de potenciales de acción continuos, decidimos evaluar si el disparo de potenciales de acción en las células cromafines fetales y neonatales depende de la activación de los canales de sodio. Empleamos el bloqueador clásico de los canales de sodio, tetrodotoxina (TTX $1 \mu\text{M}$) para inhibir a los Na_v 's tanto en células fetales como en células neonatales. La figura 5 demuestra que el bloqueo por TTX no es suficiente para detener completamente la actividad eléctrica espontánea en las células fetales (5 de 5). La tetrodotoxina tampoco detuvo completamente la actividad espontánea de la mayoría de las células cromafines neonatales registradas (15 de 18; figura 6). En algunas células, la aplicación de TTX provocó cambios en la frecuencia de disparo: en 9 de 18 células, la frecuencia de disparo disminuyó (control: $1.739 \pm 0.84 \text{ Hz}$. TTX: $0.72 \pm 1.06 \text{ Hz}$, $p < 0.038$) en 4 de 18 células la frecuencia de disparo aumentó ligeramente pero la diferencia no fue significativa (control: $0.83 \text{ Hz} \pm 0.73 \text{ DE}$, TTX: $1.12 \pm 0.79 \text{ Hz}$, $p < 0.61$). La aplicación de TTX también produjo una disminución significativa en la amplitud del primer componente negativo de la corriente de acción (ver figura

5 y 6, ver también figura 8; (control: -17.55 ± 7.1 pA; TTX: -5.36 ± 1.07 pA, $p < 0.00025$). Ninguno de los dos componentes se recuperó completamente luego del lavado.

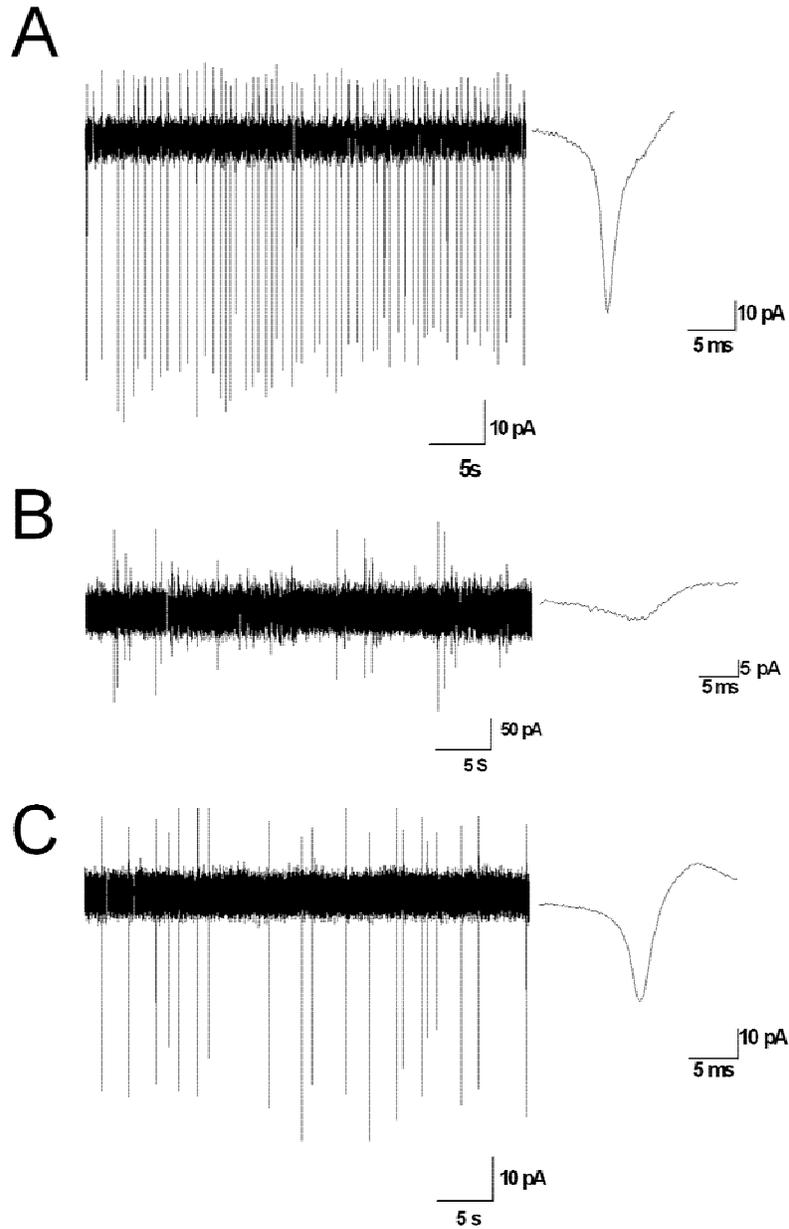


Figura 5. Efecto de la aplicación de TTX sobre la actividad eléctrica espontánea en las células cromafines fetales. A. Control, el trazo mostrado al lado derecho corresponde al promedio de todos los eventos ocurridos durante el registro. B. Actividad de la célula en presencia de TTX 1 μ M. C. Cinco minutos después de terminada la aplicación de TTX y de intercambiar la solución.

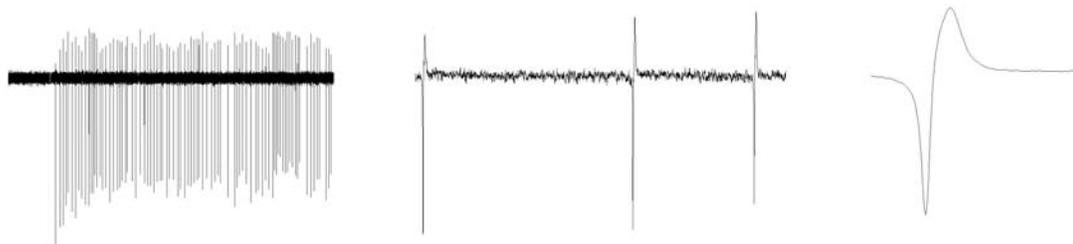
En las células cromafines fetales, la aplicación de TTX también disminuyó la amplitud de ambos componentes de la corriente de acción, aunque la comparación no se hizo directamente, pues la amplitud de ambos componentes se hizo tan pequeña en los eventos individuales, que su medición fue imposible en la mayoría de los casos.

El disparo espontáneo de potenciales de acción continuó aún en los casos en los que TTX fue aplicada por periodos de tiempo prolongados (>10 min) o en presencia de concentraciones mayores (TTX 10 μ M). El lavado de la toxina mediante la perfusión rápida del medio extracelular, revirtió sólo parcialmente los efectos de la droga.

Propiedades de la corriente de sodio en células fetales y neonatales

Existen dos posibles explicaciones del por qué la aplicación de TTX no frena completamente la generación espontánea de potenciales de acción. Por un lado, es posible que a diferencia de las células adultas, las células fetales y neonatales expresen Na_v 's resistentes a TTX. Alternativamente, es posible que otros canales sean los responsables de llevar a la célula su umbral de disparo. Con el fin de distinguir entre estas dos alternativas decidimos registrar las corrientes de sodio (I_{Na}) en estas células por medio de la técnica de 'patch-clamp' en configuración de célula entera y evaluar directamente la sensibilidad de las corrientes de sodio al TTX.

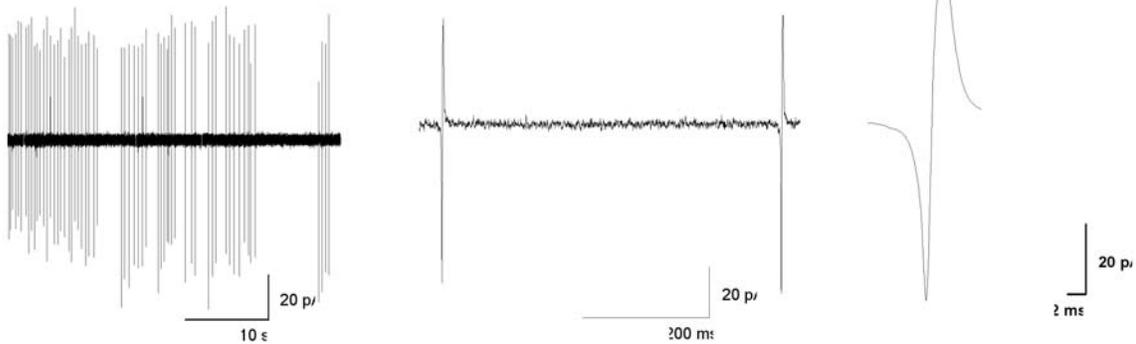
A CONTROL



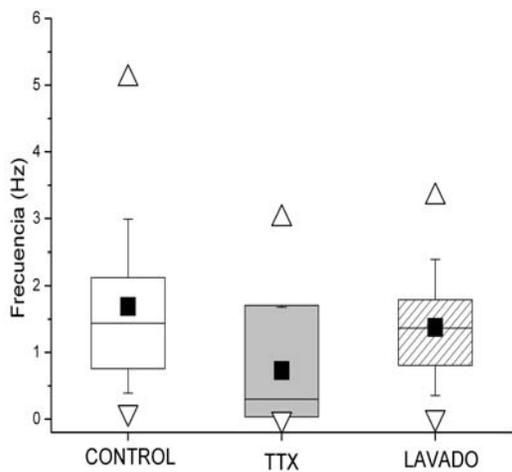
B TTX 1 μ M



C LAVADO



D



E

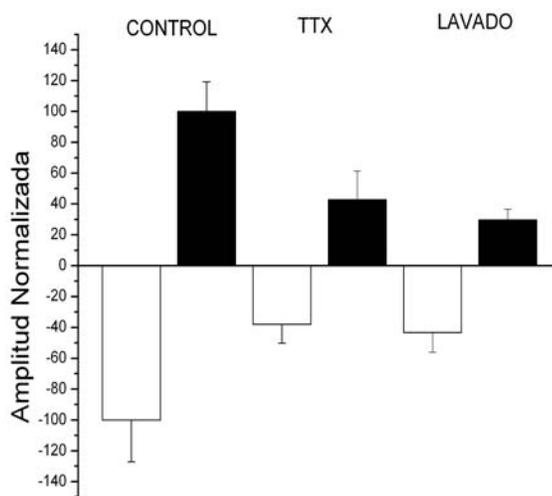


Figura 6 (Ver Página Anterior). Efecto de TTX sobre la actividad espontánea de las células neonatales. A. Control, el trazo derecho corresponde al promedio de todos los eventos ocurridos durante el registro. B. Actividad de la célula en presencia de TTX 1 μ M. C. 5 minutos después de terminada la aplicación de TTX y de intercambiar la solución mediante perfusión continua. D. El bloqueo de I_{Na} disminuye la amplitud del ambos componentes de la corriente de acción (negativo y positivo). La grafica muestra el valor promedio de las amplitudes del primer y segundo componentes en relación al control. La línea sobre cada barra representa la desviación estándar (n=18) E. TTX disminuye la frecuencia de disparo en la mayoría de las células. Los símbolos siguen la convención establecida en la figura 3.

Las células fetales y neonatales registradas mantuvieron valores de capacitancia estables durante los registros. Además, el valor de la capacitancia de las células fetales y neonatales no fue significativamente diferente (células fetales: 6.704 pF \pm 2.37 DE, n=19; células neonatales: 6.98 pF \pm 1.82 DE, n=18; p < 0.953). Para provocar la activación de las corrientes, se aplicó una serie de pulsos de voltaje como los mostrados en la figura 2 (-45 mV a +60 mV en pasos de 10 mV) durante 25 ms desde el potencial de mantenimiento de -90 mV a intervalos entre pulsos de 1 s, para evitar la acumulación de la inactivación. El potencial de mantenimiento se escogió muy negativo para prevenir la inactivación de estado estacionario (Hollins e Ikeda, 1991) de los canales de sodio rápidos y no correr el riesgo de subestimar la densidad de la corriente de sodio.

La figura 7 muestra que la I_{Na} de las células fetales y neonatales se activa rápidamente, alcanzado su amplitud máxima en menos de un milisegundo y que se inactiva después rápidamente. Para permitir la comparación de las corrientes de las células fetales y neonatales, los valores de corriente obtenidos para cada

célula a todos los voltajes fueron normalizados por el valor de la capacitancia de la célula de la que se obtuvieron. Con estos datos, se generaron curvas corriente-voltaje al graficar el máximo de la corriente obtenida para cada uno de los pulsos de prueba contra el valor del voltaje del pulso aplicado y se muestran en la figura 3A. No se aplicaron pulsos de corriente lo suficientemente positivos como para observar el punto de reversión de la corriente (E_{Na}), sin embargo la extrapolación lineal a partir de los últimos puntos (-10 mV a -45mV) de las graficas presentadas en la figura 7C (potenciales a los cuales g_{Na} se ha activado máximamente -ver figura 7D, panel derecho-, por lo cual la magnitud de la corriente depende solamente del gradiente para el sodio a través de la membrana) nos permiten estimar que tiene un valor de alrededor de 55 mV. Este valor es consistente con el valor esperado a partir de la predicción de E_R para I_{Na} usando la ecuación de Nerst:

$$E_{Na} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Na^+]_{ext}}{[Na^+]_{int}}$$

Para la temperatura ambiente del cuarto de registro (~25 °C) el término RT/zF toma el valor de 25.69 mV para las concentraciones de sodio empleadas ($[Na^+]_{ext} = 145$ y $[Na^+]_{int} = 15$ mV) $E_{Na} = 58.28$ mV. La corriente de sodio en células fetales tuvo una densidad máxima de $110 \pm 25 \mu A/\mu F$ (-10 mV, n=18, Figura 6C) mientras en las células neonatales la densidad máxima de corriente fue significativamente mayor: $220 \pm 60 \mu A/\mu F$ (-10 mV, n=18, $p < 0.0208$, Figura 6C).

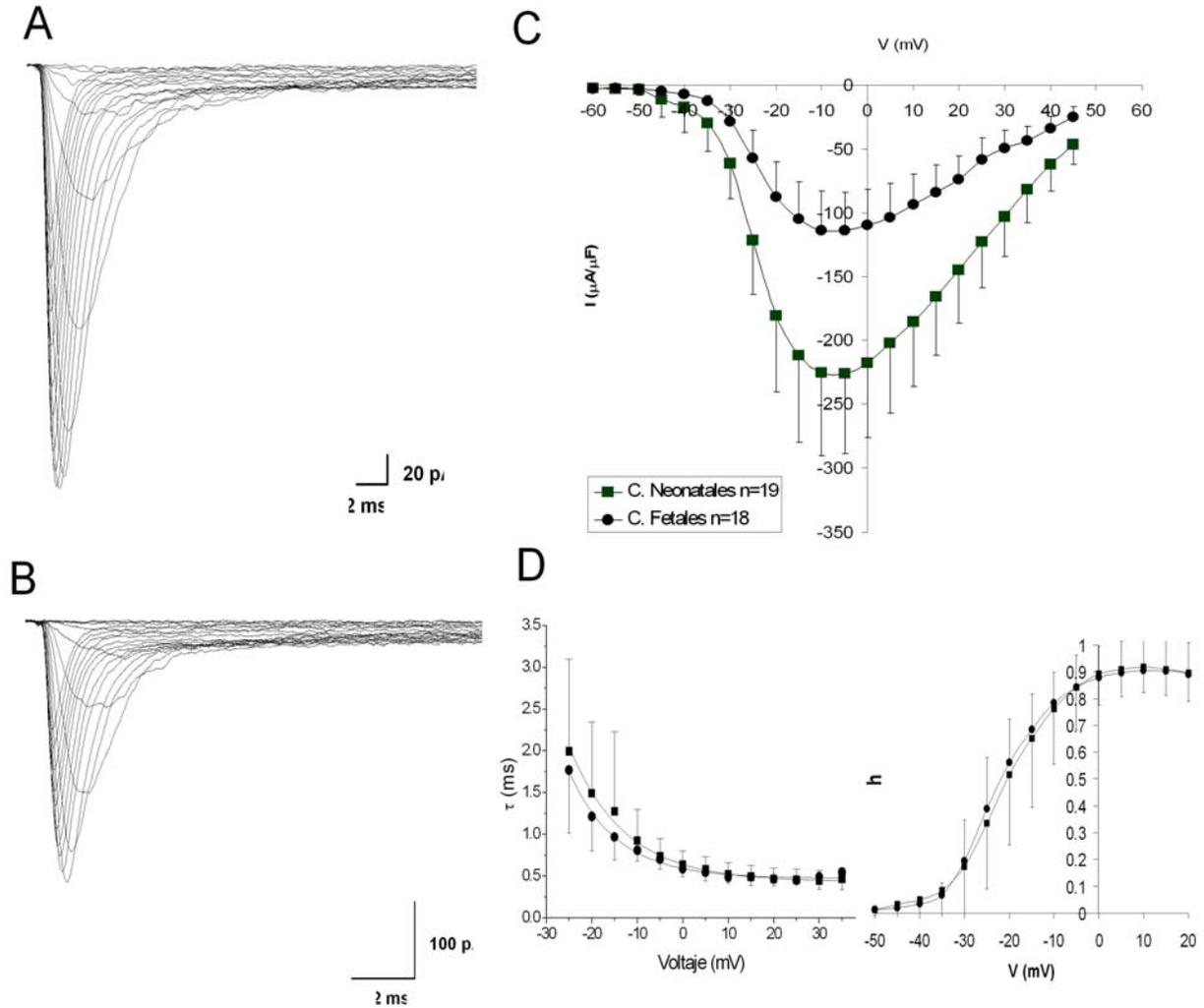


Figura 7. Propiedades de la corriente de sodio en células fetales y neonatales. A. Ejemplo de la familia de corrientes obtenidas en respuesta al protocolo mostrado en la parte superior en células neonatales. B Familia de corrientes de I_{Na} obtenidas en células fetales. C. Curva corriente voltaje de la corriente registrada en células fetales y neonatales, el valor máximo de I_{Na} obtenida para cada pulso fue normalizado por el valor de la capacitancia de la célula de la que se obtuvo, resultando así la densidad de corriente. Las líneas perpendiculares al eje x muestran la desviación estándar de cada punto graficado. D. Comparación de la constante de inactivación en función del voltaje (izquierda) y de la de activación (derecha).

Como se muestra en la figura 8, una concentración de 1 μM de TTX es capaz de bloquear efectivamente la I_{Na} tanto en células fetales como en células neonatales revelando un componente de corriente entrante debido a la activación de los canales de calcio. Las características de las curvas de activación e inactivación de las corrientes de sodio fueron similares para ambos tipos de células. El valor de los parámetros de activación para la corriente de sodio de las células fetales fue $V_{1/2} = -20 \text{ mV}$; $k = 3.5$ y los de las células neonatales fueron $V_{1/2} = -21 \text{ mV}$; $k = 3.6$. La constante de tiempo de inactivación de la I_{Na} es otro parámetro que característico de la cinética de la corriente que fue analizado. La constante de tiempo de la inactivación fue obtenida al ajustar el decaimiento de la I_{Na} a partir de su máximo a cada voltaje a un curso exponencial. La figura 6D, panel izquierdo muestra los valores de τ_{inac} a todos los potenciales evaluados (para $V_m = -5 \text{ mV}$, Fetales: $\tau_{\text{inac}} = 0.7016 \pm 0.11 \text{ ms}$; Neonatales: $\tau_{\text{inac}} = 0.735 \pm 0.21 \text{ ms}$ $p < 0.9744$); las diferencias entre estos valores no fueron significativas. La corriente que queda después de bloquear la corriente de sodio (figuras 8A y 8B) es principalmente la corriente de calcio que poseen tanto las células fetales como las neonatales. No se encontraron diferencias significativas entre la densidad máxima de la corriente de calcio en células cromafines neonatales y fetales (para $V = -10 \text{ mV}$ Fetales: $-8.1 \pm 4.6 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ y neonatales: $-13.33 \pm 11.94 \mu\text{A}/\mu\text{F}$ $p < 0.216$).

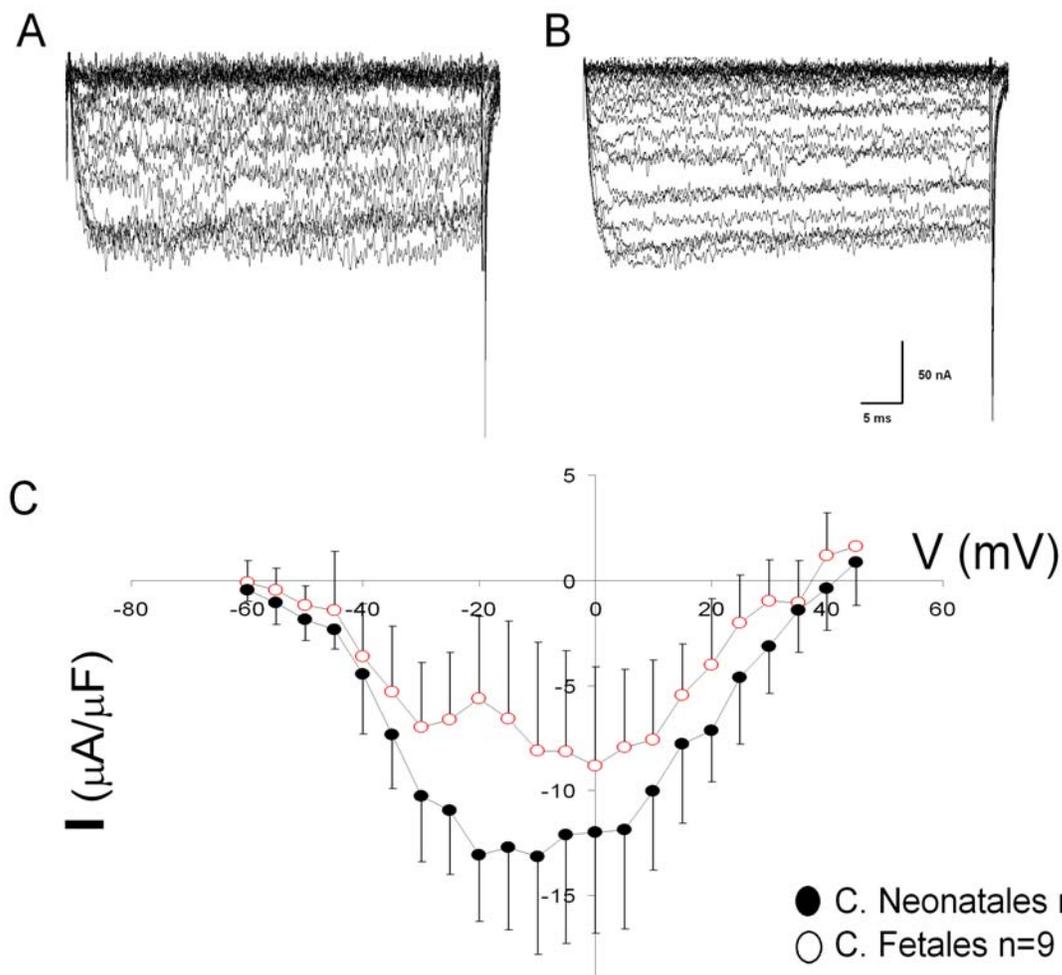


Figura 8. Las corrientes de calcio en células cromafines. A. Corriente de Calcio registradas en células fetales. B. Corriente de calcio en células neonatales C. Curva I-V, los puntos muestran el valor de la densidad promedio de la corriente y las líneas indican la desviación estándar de cada punto. $[Ca^{2+}]_o=2.0$ mM

En la figura 8C se muestran las curvas corriente-voltaje obtenidas para las células fetales y neonatales. En estas curvas I-V se puede observar que la activación de la corriente ocurre a un potencial más despolarizado (~ -50 mV) que lo esperado para las corrientes dadas por las corrientes tipo L, N y P (~ -30 mV, ver tabla II) y en la curva correspondiente a las células fetales es evidente un componente cuyo valor máximo se alcanza a ~ -30 mV el cual, por estas

características podría corresponder a un componente de corriente de calcio de tipo T (ver tabla II). El pico del segundo componente ocurre ~ -10 mV como corresponde a la corriente que fluye a través de los canales de calcio de alto umbral.

La inhibición farmacológica de los canales de calcio de tipo T no frena la actividad eléctrica espontánea

Por su rango de activación, la corriente de calcio tipo T podría ser responsable de generar la despolarización inicial que a su vez inicia los potenciales de acción espontáneos de las células cromafines. Dado que estos canales están presentes en una fracción de estas células (Bornaud et. al, 2001) y en nuestros registros de corriente de calcio hay un componente que parece corresponder a canales de calcio de tipo T, decidimos probar el efecto de un bloqueador de canales tipo T, Mibefradil ($10 \mu\text{M}$) sobre la actividad eléctrica espontánea de estas células. La aplicación de Mibefradil disminuyó de la amplitud de las corrientes de acción registradas a través del parche pero no impidió la generación espontánea de potenciales de acción en la mayoría de las células neonatales (5 de 7 Figura 9A), ni en la mitad de las células fetales (3 de 6, figura 9B). En la mayoría de las células neonatales, el Mibefradil ocasionó una discreta disminución en la frecuencia de disparo, la cual, sin embargo no resultó significativa (Control: 1.87 ± 0.8 Hz; Mibefradil: 1.67 ± 0.18 Hz; $p < 0.12$). En las células fetales, la disminución en la frecuencia fue más pronunciada y resultó

significativa (Control: 0.9 ± 0.17 Hz, Mibefradil: 0.67 ± 0.75 Hz; $p < 0.018$). La aplicación conjunta de Mibefradil $10 \mu\text{M}$ y Tetrodotoxina $10 \mu\text{M}$ tampoco fue capaz de impedir completamente la generación de potenciales de acción en la mayoría (7 de 9) de las células neonatales, pero ocasionó una reducción significativa de la frecuencia de disparo (Control 1.84 ± 1.14 Hz; Mibefradil: 0.91 ± 1.09 Hz ; $p < 0.016$; véase la figura 9C).

La aplicación de mibefradil causó una disminución significativa del componente inicial de corriente entrante en las células fetales, pero no en las células neonatales (ver tabla III). Sin embargo, el componente inicial de corriente entrante de las células neonatales si disminuyó significativamente cuando se aplicaron de manera conjunta tetrodotoxina y mibefradil.

Dependencia del calcio externo de los potenciales de acción espontáneos

Los potenciales de acción de las células cromafines dependen del flujo de corriente a través de canales de calcio. En apoyo a esta hipótesis tenemos que la sustitución del calcio externo en la solución de registro por magnesio (2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{externo}}$ sustituido por 2.5 mM $[\text{Mg}^{2+}]$, para un total de 5 mM $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{externo}}$, la concentración residual de Ca^{2+} en esta solución es $\sim 10 \mu\text{M}$) resulta en el completo cese del disparo espontáneo de los potenciales de acción (véase la figura 10A-C). En la mayoría de los casos (5 de 6), la actividad no se recuperó aún después de periodos prolongados de espera (15-20 min). La figura 10E

muestra un ejemplo de los efectos de retirar del calcio del medio externo sobre la frecuencia de disparo de una célula cromafín y la recuperación parcial de la actividad luego del lavado. Se ha reportado que las células cromafines de rata poseen canales de calcio de tipo L, sensibles a dihidropiridinas (Artalejo, AR, 2000) y que estos canales son importantes para la secreción de catecolaminas.

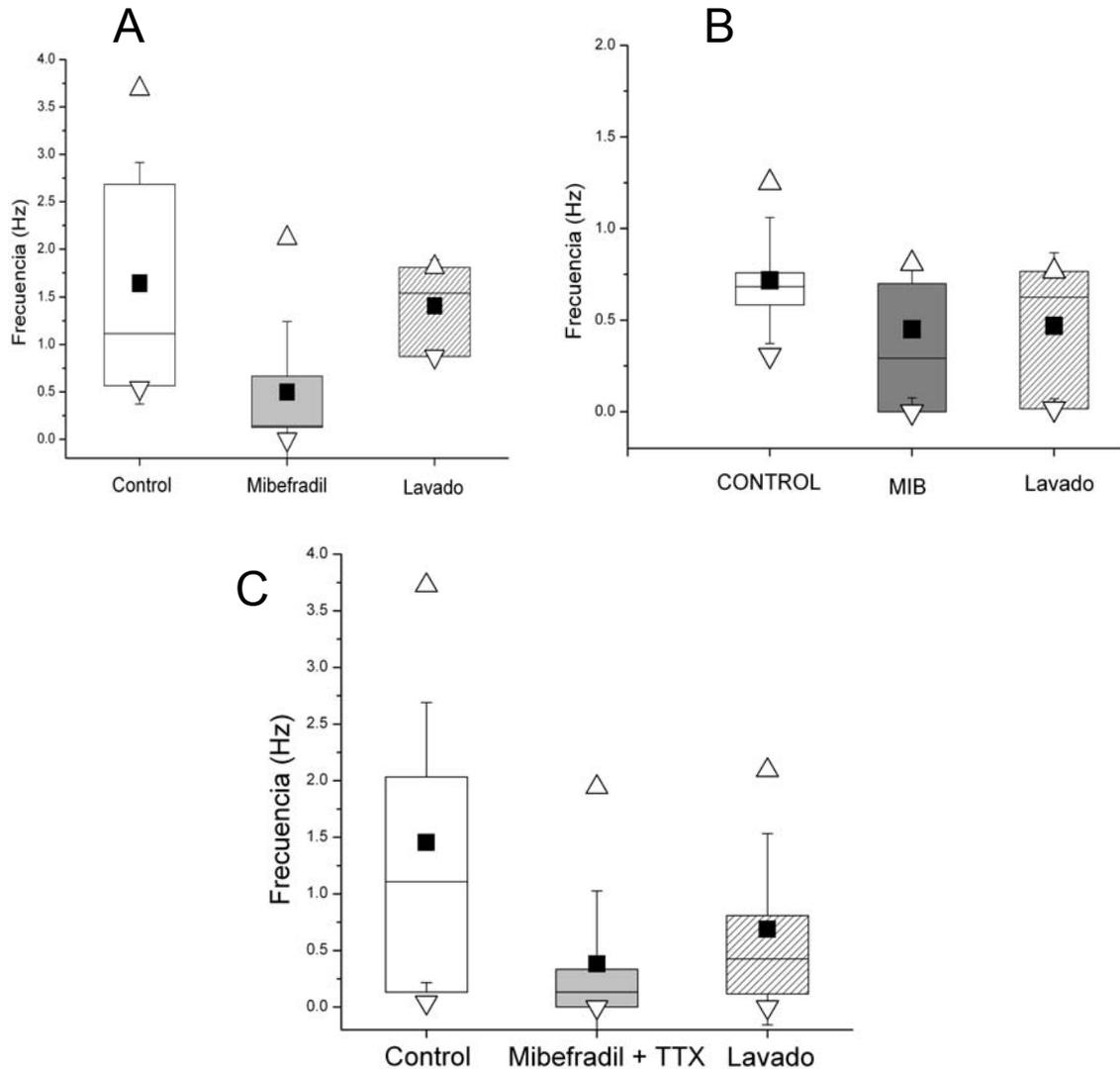


Figura 9. Efectos del Mibefradil sobre la frecuencia de disparo de las células neonatales y fetales. A. Células Neonatales. B. Células Fetales C. Efecto de la combinación de MIB y TTX sobre las células neonatales. Los símbolos siguen las convenciones establecidas en la figura 3.

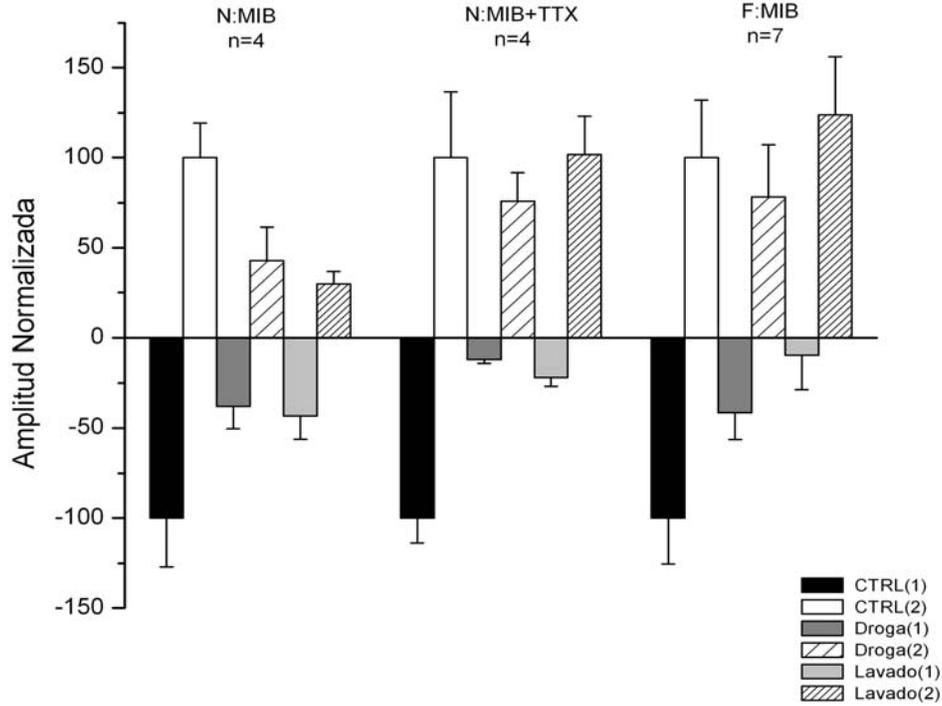


Figura 10. La inhibición farmacológica de los canales de calcio tipo T disminuye la amplitud del componente inicial de corriente entrante de las corrientes de acción espontáneas. La grafica muestra el valor promedio de amplitud del primer y el segundo componentes de los eventos registrados en condiciones control, luego de MIB o MIB/TTX y después del lavado. Las barras **negras** representan la amplitud del primer componente de corriente entrante en relación al control, mientras que las **blancas** representan la amplitud del segundo componente de corriente saliente en relación al control. Las líneas perpendiculares al eje indican el valor de la desviación estándar.

<i>C. Neonatales- I (pA)</i>					
CONTROL	D.E.	MIB	D.E.	LAVADO	D.E.
-38.6696	5.339573	-4.57519	0.835675	-43.2889	12.85535
8.490009	3.108484	6.442641	1.338816	8.631329	1.819134
CONTROL	D.E.	MIB + TTX	D.E.	LAVADO	D.E.
-7.19817	1.953958	-2.73113*	0.880346	-3.11601	0.92535
12.04814	2.319736	5.159009	2.231139	3.590522	0.83251
<i>C. Fetales I (pA)</i>					
CONTROL	D.E.	MIB	D.E.	LAVADO	D.E.
-34.5624	8.814382	-14.2381#	5.221051	-10.1152	3.206303
13.78679	4.396621	10.79169	3.985196	17.08993	4.444975

Tabla III. Efecto del mibefradil sobre las amplitudes de los componentes de las corrientes de acción de las células fetales y neonatales.* $p < 0.01128$, # $p < 0.0395$.

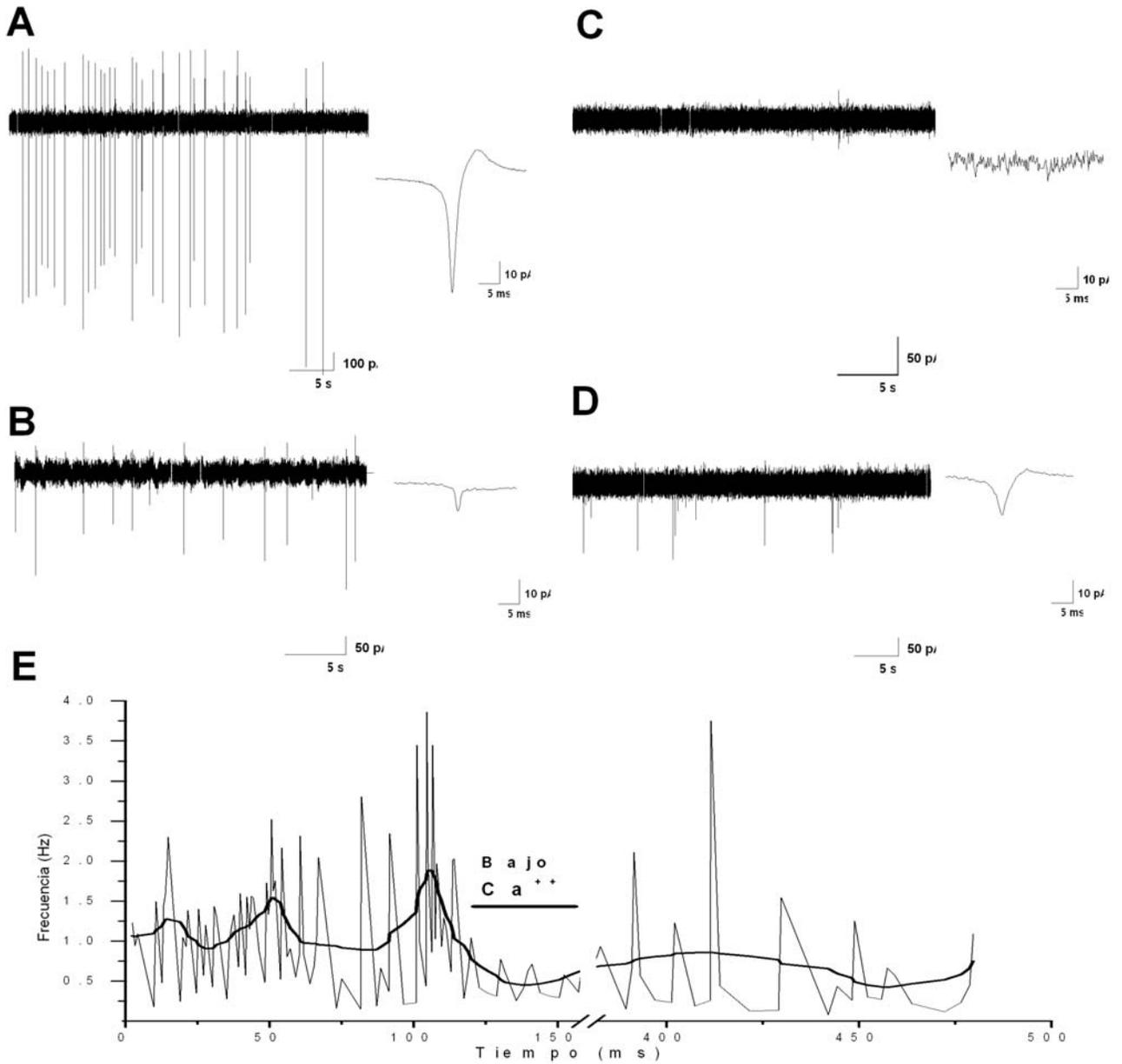


Figura 11. La ausencia de calcio ocasiona el completo cese del disparo espontáneo de las células cromafines fetales. A: Control $[Ca^{2+}]_{ext} = 2.0 \text{ mM}$ B: 15 s después del intercambio de la solución por solución con bajo calcio $[Ca^{2+}] < 10 \text{ }\mu\text{M}$. C. Un minuto después del intercambio de la solución. D. 5 min después de bañar la preparación con una solución de calcio normal. E: Frecuencia instantánea del disparo durante el registro. La línea delgada representa los valores absolutos, la línea gruesa es el promedio de cada punto con los cinco puntos vecinos más cercanos.

La inhibición específica de los canales de calcio tipo L con Nifedipina (5 μM) tiene resultados similares a los de la remoción del calcio del medio extracelular: en todos los casos examinados, la aplicación de nifedipina ocasiona el cese completo del disparo de potenciales de acción, tanto en las células cromafines fetales (, 10 de 10; véase la figura 11), como de las células cromafines neonatales (3 de 3; datos no mostrados) algunas células reinician su actividad al lavarse la droga del medio externo, (3 de 10).

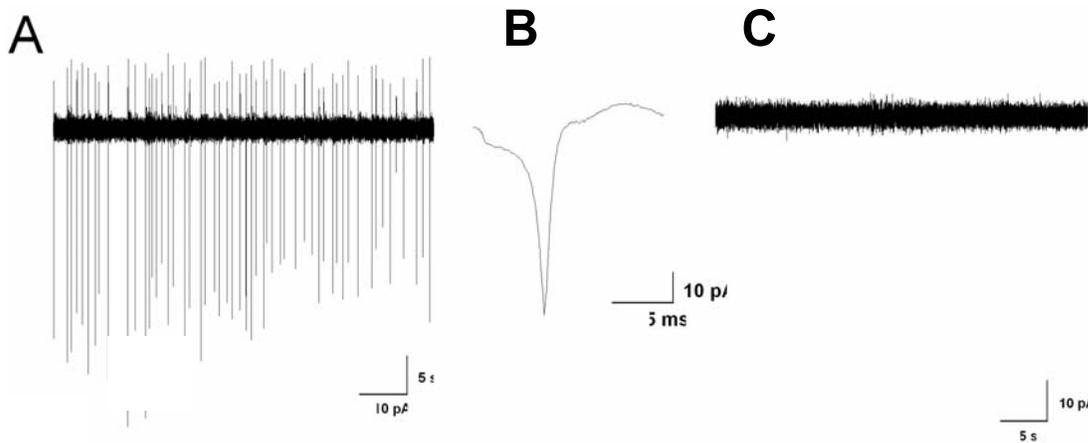


Figura 12. La inhibición farmacológica de los canales de calcio tipo L abole completamente el disparo espontáneo de potenciales de acción. A. Registro control B. Forma promedio de los eventos en A. C. La actividad desaparece después ~5 s de la aplicación de Nifedipina

Efecto del bloqueo de los canales de potasio tipo BK sobre la actividad espontánea.

Se ha reportado que las células cromafines, tanto las adultas como las neonatales, expresan dos tipos de corriente de potasio activada por calcio de tipo BK, cuya actividad es esencial para asegurar la repolarización de la célula después del disparo del potencial de acción. Estas corrientes son necesarias

para regular la frecuencia de disparo de la célula. Su inhibición, al impedir la repolarización después del disparo de cada potencial de acción y debería interferir con el disparo continuo de potenciales de acción. Como se muestra en la figura 13, la aplicación de CbTX 100 nM, inhibidor de la corrientes de potasio de tipo BK presente en estas células, causa la total desaparición de la actividad espontánea de potenciales de acción tanto de las células neonatales (figura 12, n=7) como de las células fetales (n=3, datos no mostrados).

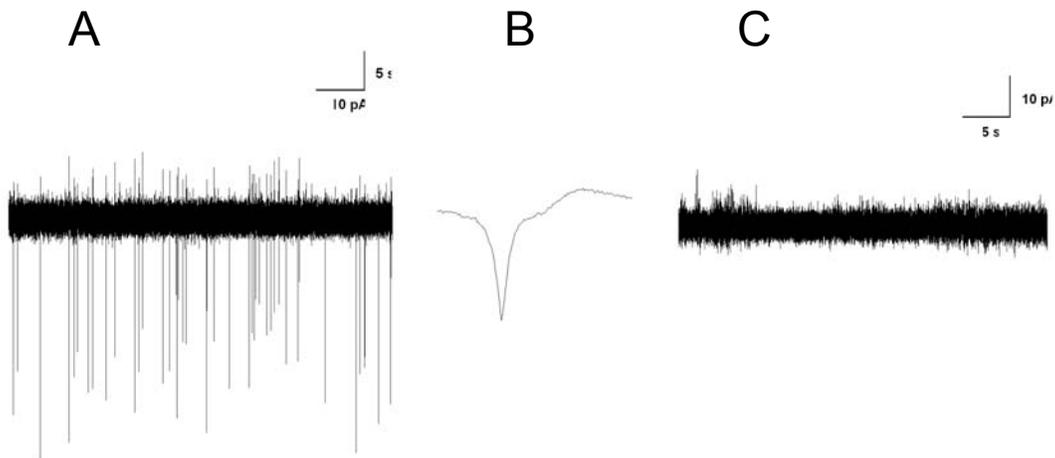


Figura 13. El bloqueo de los canales de K⁺ tipo BK ocasiona el cese del disparo espontáneo. A. Registro control B. Forma promedio de los eventos en A. C. Después de un minuto de la aplicación de Caribdotoxina la actividad desaparece.

Discusión

Mecanismo de generación de la actividad espontánea en células cromafines inmaduras

El mantenimiento de la actividad espontánea requiere de la interacción entre corrientes intrínsecas de la célula que actúan para llevarla al umbral de disparo, despolarizarla rápidamente y repolarizarla de nuevo a un potencial lo suficientemente negativo, para permitir que la siguiente despolarización sea efectiva. En neuronas del subtálamo (McCormick y Huguenard, 1992) y neuronas cerebelosas de Purkinje (Raman y Bean, 2001), las corrientes de calcio de tipo T y la corriente de sodio resurgente han sido identificadas como responsables de la despolarización subumbral que permite el disparo continuo de potenciales de acción. En el presente trabajo, hemos encontrado que el bloqueo de ambas corrientes (I_{Na} e $I_{Ca(t)}$), ya sea separadamente o de manera conjunta, no suprime la actividad espontánea, aunque sí causa la reducción de la frecuencia y amplitud de los potenciales de acción registrados. El resultado más sorprendente es, quizás, que la inhibición de la corriente de sodio no impida la generación de potenciales de acción, pues aunque no fuese responsable de iniciar la despolarización subumbral que permite la generación continua de potenciales de acción, se espera que su bloqueo impida a la célula cruzar el

umbral de disparo del potencial de acción, como ocurre frecuentemente en las neuronas. Esto no parece deberse a que exista otra corriente de sodio insensible a TTX que sea capaz de mediar el disparo de los potenciales de acción, ya que la aplicación de TTX resultaba en la abolición casi total (~%96) de la corriente de sodio. Por otro lado, demostramos que, tanto la ausencia de calcio externo, como la inhibición de los canales de calcio de tipo L terminan con los disparos espontáneos, por lo cual concluimos que la activación de la corriente I_{Ca} de tipo L sensible a dihidropiridinas, presente en estas células, es indispensable para la generación de potenciales de acción espontáneas. La contribución de estos canales a la generación de potenciales de acción es doblemente importante, ya que de la entrada de calcio que ocasiona su activación activa los canales de potasio de pendientes del potencial y de la concentración intracelular de calcio (BK). Como demostramos en este trabajo, la inhibición de estos canales ocasiona que las células dejen de disparar potenciales de acción espontáneamente. Es posible que cuando estos canales no participan (ya sea porque el calcio intracelular no se eleva, o porque los canales están inhibidos farmacológicamente, la repolarización de la membrana no se lleva a cabo completamente. En estas condiciones algunas corrientes iónicas de Na^+ y de Ca^{2+} que se inactivan con la despolarización, no se restablecen completamente, inhibiéndose así la generación espontánea de potenciales de acción.

Nuestros datos indican que $I_{Ca(t)}$ tampoco es indispensable para sostener el disparo continuo de potenciales de acción en las células cormafines. El efecto del inhibir farmacológicamente a estos canales es poco notorio en las células

cromafines neonatales, las cuales se ha reportado que expresan funcionalmente poca corriente debida a $I_{Ca(t)}$ (Bornaud, et al., 2000). Es poco probable que este resultado resulte de la falta de efectividad del mibefradil para lograr el bloqueo $I_{Ca(t)}$. La afinidad del mibefradil por los canales que dan origen a $I_{Ca(t)}$ en células cromafines fetales ha sido examinada con anterioridad ($K_D = \sim 200nM$, Bornaud et al., 2000), en condiciones de fijación de voltaje. Nuestros registros, sin embargo no fueron hechos en condiciones de fijación de voltaje. Diversos autores han reportado que el bloqueo por mibefradil depende de las condiciones de registro, y factores como el acarreador de corriente empleado y la temperatura ambiente pueden afectar considerablemente su eficacia. En el presente trabajo, sin embargo, esto no introduce dudas acerca de la eficacia del bloqueo por mibefradil, ya que las condiciones empleadas (2 mM Ca^{2+} externo, temperatura ambiente de 18-25 °C) favorecen la unión del mibefradil al canal de calcio de tipo T (ver discusión en Martin, et al, 2000). Si bien esto nos permite concluir que $I_{Ca(t)}$ no es indispensable para la generación de PA's en las células cromafines neonatales, la conclusión que deriva de los resultados es menos contundente pare el caso de las células cromafines fetales. En las células fetales, la aplicación del mibefradil logra detener la actividad eléctrica espontánea en la mayoría de los casos. Estos resultados nos sugieren que posiblemente en etapas tempranas del desarrollo, la contribución de $I_{Ca(t)}$ a la corriente subumbral sea más significativa que en las células neonatales y adultas. Esta hipótesis aguarda comprobación experimental. Podríamos especular que en las células neonatales, en las que I_{Na} es mayor, la dependencia

de $I_{Ca(t)}$ es menor ya que I_{Na} es capaz por si sola de llevar a la célula al umbral de disparo.

Nuestros resultados apuntan a que el mecanismo empleado por las células cromafines fetales y neonatales para producir potenciales de acción espontáneos difiere del empleado por algunas neuronas. Esta diferencia, quizás esté relacionada con el patrón de disparo que presentan las células cromafines. Las neuronas del subtálamo, al igual que las neuronas de Purkinje del cerebelo, disparan potenciales de acción espontáneamente a alta frecuencia, en ocasiones pudiendo llegar hasta los 50 Hz (Haüsser y Clark, 1997). En cambio, la frecuencia de disparo promedio de las células cromafines fetales y neonatales es muy inferior a este valor (~ 1 Hz) y muy rara vez alcanza valores superiores a los 6 Hz. Las únicas neuronas cuya frecuencia de disparo espontáneo se acerca a estos valores tan bajos son las neuronas del núcleo supraquiasmático. La frecuencia de disparo de estas neuronas cambia a lo largo del día ~ 8 Hz en el día y $\sim 2.5-1$ Hz durante la noche, enviando una señal que constituye el ritmo circadiano principal en el cerebro. El origen de las oscilaciones espontáneas durante el día y la noche no se conoce con precisión. Durante el día, una conductancia aún no caracterizada, ocasiona una despolarización continua de la célula mientras que $I_{Ca(L)}$ se activa periódicamente ocasionando oscilaciones en el potencial de membrana y fluctuaciones lentas de la concentración interna de calcio (Pennartz, et al, 2002). No obstante $I_{Ca(L)}$ no es el único contribuyente a las oscilaciones del calcio interno, ya que una forma de oscilación de la $[Ca^{2+}]_i$ subsiste en presencia de un inhibidor de $I_{Ca(L)}$. Hasta

ahora, no disponemos de las evidencias que indiquen que la actividad espontánea de las células cromafines inmaduras pudiera regularse por mecanismos similares.

Las potenciales de pueden iniciarse por fluctuaciones subumbrales del potencial de membrana

Nuestros registros revelan la presencia de cambios en el potencial de la célula de forma indirecta, ya que la amplitud de las espigas registradas depende tanto de la capacitancia de la membrana que se encuentra dentro de la pipeta, como de la resistencia R_s , (véanse métodos) dos parámetros imposibles controlar durante el registro. Las conclusiones obtenidas aquí están sujetas a las limitaciones de registro electrofisiológico. No obstante, cabe mencionar que para el análisis se seleccionaron únicamente células cuyo registro mostraba espigas rápidas (~ 1.5 ms) y de amplitud considerable y en las cuales R_s no varió de manera importante durante el periodo de registro. Es posible por tanto, que las corrientes observadas después de la aplicación de algunas drogas no correspondan a potenciales de acción sino a fluctuaciones breves del potencial de membrana. Esto es consistente con el alargamiento del curso temporal de las señales eléctricas observado en muchos casos (~ 30 ms figura 6, panel B) que excede por mucho el tiempo en el que ocurren la mayoría de los PA's (Yas: esto no es tan cierto. Recuerda que el potencial de acción se puede alargar por inhibición o activación incompleta de los canales BK). Para distinguir entre

oscilaciones del potencial de membrana y PA's con claridad es necesario realizar registros intracelulares, este tipo de registro nos permitiría establecer si existe algún tipo de actividad eléctrica subumbral que continúe en la ausencia de los potenciales de acción y provoque su disparo continuo en condiciones basales. Asimismo, sería deseable obtener mediciones precisas de todas las corrientes iónicas presentes en las células cromafines inmaduras. La técnica de *patch clamp* de célula entera puede proporcionarnos los parámetros necesarios para modelar la interacción entre las diversas conductancias presentes y entender qué combinación de factores permite la generación de PA's de forma continua.

Papel de la secreción de catecolaminas durante la etapa fetal

Existen otras conductancias iónicas en las células cromafines que podrían participar en lograr la despolarización necesaria para iniciar la actividad espontánea. Estas conductancias son el canal de potasio sensible a pO_2 , $K_{(O)}$ identificado en las células cromafines neonatales (Thompson, et al., 1998, Mochizuki-Oda, et al., 1997, Takeuchi, et al., 2001) y una conductancia catiónica no selectiva, sensible a pCO_2 , $CCNS_{CO_2}$, identificada en células cromafines fetales (Muñoz AM, et al., 2005). Ambos tipos de canales son capaces de despolarizar a la célula cuando el organismo sufre de hipoxia. Los canales $K_{(O)}$ se cierran cuando la concentración de oxígeno en el medio disminuye mientras que los canales $CCNS_{CO_2}$ se activan cuando aumenta la pCO_2 . La

despolarización causada por la activación estos canales *in vivo* podría determinar un aumento en la frecuencia de disparo y de la secreción de catecolaminas. Durante la gestación, la proporción pO_2/pCO_2 en la sangre fetal decae transitoriamente a consecuencia de las contracciones uterinas espontáneas, las que disminuyen el flujo sanguíneo y la presión arterial fetales. En la etapa terminal de la gestación, la respuesta del sistema cardiovascular a la hipoxia aguda es mediada por la acción de los baroreceptores del cuerpo carotídeo. Sin embargo, en etapas tempranas del desarrollo gestacional, el reflejo de los baroreceptores aún no esta presente y el sistema simpático inmaduro es incapaz de regular la constricción de las arterias para incrementar la presión arterial. En la oveja, el feto de responde a esta situación aumentando la concentración de CA's en sangre. Las CA's promueven la redistribución de la sangre hacia el corazón y el cerebro y el de aumento en la frecuencia cardiaca (Jensen A, 1996). La respuesta a la hipoxia mediada por la catecolaminas es esencial para la sobrevivencia durante la gestación, al menos en el ratón. El 90% de los fetos de ratón incapaces de producir CA's mueren antes del día 15.5 de gestación (Zhou QY, et al., 1995). Estos animales carecen de ambos alelos del gen que codifica para la enzima tirosina hidroxilasa (TH), una enzima limitante para la síntesis de CA's. La muerte ocurre a causa de congestión cardiaca aguda, a menos que las madres reciban un suplemento de L-DOPA, el precursor de las CA's, durante la gestación. Al igual que los animales TH^{-/-}, los animales normales a los que se les administra un bloqueador genérico de los receptores β -adrenérgicos a los que se une la adrenalina, mueren a causa de

una falla cardiaca cuando son sometidos a hipoxia *in vitro* (Jensen A, 1996, Portbury, et al., 2003). Ya que la maquinaria de secreción de las células fetales es funcional (Bornaud, 2001) y poseen los canales necesarios para despolarizar su membrana en respuesta a la hipoxia, es posible que en la rata las células cromafines fetales y neonatales también se encarguen de mediar esta respuesta fisiológica.

Conclusiones

1. Las células cromafines fetales y neonatales expresan una corriente rápida entrante de sodio sensible a tetrodotoxina.
2. Las células cromafines neonatales poseen mayor densidad de corriente de sodio que las células cromafines fetales.
3. La activación de las corrientes de sodio rápidas y de la corriente de calcio de tipo T no es indispensable para la generación espontánea de potenciales de acción en las células cromafines fetales y neonatales, dado que la actividad eléctrica persiste después de la inhibición farmacológica de estas corrientes
4. La inhibición farmacológica de las corrientes de sodio y de calcio de tipo T disminuye la amplitud de las corrientes de acción registradas extracelularmente, así como la frecuencia de disparo. Ambos efectos son reversibles parcialmente después del lavado.
5. La presencia de calcio externo y la actividad de los canales de calcio de tipo L son indispensables para la generación de la actividad espontánea, dado que dicha actividad eléctrica desaparece después de la inhibición farmacológica de estas corrientes de tipo L o de la remoción del calcio externo.

6. La activación de los canales de potasio activados por calcio (BK) es indispensable para la generación continua de PA's, probablemente debido a que la repolarización mediada por estos canales es necesaria para remover la inactivación de los canales de Na y de Ca dependientes del voltaje.

Bibliografía

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell, 4^{ta} edición. Garland Science Ed. Capítulo 15, pp. 860-861, 2002.

Allen M. Scher. Cardiovascular Control, Capítulo 51, página 976-982, dentro de "Textbook of Physiology: Circulation, respiration, body fluids, metabolism and endocrinology", Vol. 2, 21^{ra}. Patton, et al. editores. W.B. Saunders Company. 1989.

Artalejo AR. Electrical Properties of Adrenal Chromaffin Cells Capítulo 12 pp 260-262 en "The electrophysiology of neuroendocrine cells". Scherübl H y Hescheler J, Editores. CRC press, 1995.

Augustine GJ and Neher E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* May;450:247-71, 1992.

Barbour B, Isipe P. Combining loose cell-attached stimulation and recording. *J Neurosci Meth.* 103:199-208, 2000.

Becherer U, Moser T, Stümer W, Oheim M. Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat Neurosci.* Aug 6(8):846-853, 2003.

Bornaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, Shimahara T. Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol.* Nov 15:537(Pt1)35-44, 2001.

Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S. Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. *J. Physiol.* Dec;263(3):447-39, 1976.

Burgoyne RD, Cheek TR, Morgan A, O'Sullivan AJ, Moreton RB, Berridge MJ, Mata AM, Colyer J, Lee AG y East JM. *Nature.* 342, 72-74, 1989.

Cannon W. The way of an investigator. Scientist's experiences in medical research. 1945

Cheek TR. The spatial aspects of calcium signaling. *J Cell Science.* 93:211-16, 1989.

Cheek TR, O'Sullivan AJ, Moreton RB, Berridge MJ, Burgoyne RD. The caffeine sensitive Ca^{2+} store in bovine adrenal chromaffin cells; an examination of its role in triggering secretion and Ca^{2+} homeostasis. *FEBS Lett.* Jun 18;266(1-2):91-5, 1990.

Conley EC. "The Ion Channel Facts Book. Intracellular ligand-gated channels". Entry 27 pp 612. Academic Press. 1996.

Cornett LE. The adrenal medulla. Capítulo 65 dentro de "Textbook of Physiology: Circulation, respiration, body fluids, metabolism and endocrinology", Vol. 2, 21^{ra} edición. Patton, et al. editores. W.B. Saunders Company. 1989.

Corrette BJ, Bauer CK, Schwartz JR. Electrophysiology of anterior pituitary cells. Capítulo 6, pp. 124-125 dentro de "The electrophysiology of neuroendocrine cells". Scherübl H y Hescheler J, editores. CRC press, 1995.

D'Andrea P, Codazzi F, Zachetti D, Meldolesi J, Grohovaz F. Oscillations of cytosolic calcium in rat chromaffin cells: dual modulation in frequency and amplitude. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 15;205(2):1264-9, 1994.

D'Andrea P, Zachetti D, Meldolesi J, Grohovaz F. Mechanism of [Ca²⁺] oscillations in rat chromaffin cells. Complex Ca(2+)-dependent regulation of a ryanodine-insensitive oscillator. *J Biol Chem*. Jul 15;268(20):15213-20, 1993.

D'Andrea P, Thorn P. Ca²⁺ signaling in rat chromaffin cells: interplay between Ca²⁺ release from intracellular stores and membrane potential. *Cell Calcium*. 19(2):113-123, 1996.

Do MT, Bean BP. Subthreshold sodium currents and pacemaking of subthalamic neurons: modulation by slow inactivation. *Neuron* 39:109-120, 2003.

Douglas WW, R. P. Rubin. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to Acetylcholine. *J Physiol.* 159, 40, 1961.

Duan K, Yu X, Zhang C, Zhou Z. Control of secretion by temporal patterns of action potentials in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* Dec 3;23(35):11235-43, 2003.

Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and Calcium currents in bovine chromaffin cells. *J Physiol.* 331:599-635, 1982.

Finnegan JM, Wightman RM. Correlation of real-time catecholamine release and cytosolic Ca^{2+} at single bovine chromaffin cells. *J Biol Chem.* Mar 10;270(10):5353-9, 1995.

Finnegan JM, Borges R, Wightman RM. Comparison of cytosolic Ca^{2+} and exocytosis responses from single rat and bovine chromaffin cells. *Neuroscience.* 71(3):833-843, 1996.

Fomina AF, Nowycky MC. A current activated on depletion of intracellular Ca^{2+} stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* May 19(10):3711-3722, 1999.

Gandía L, Borges R, Albillos A, García AG. Multiple types of calcium channels subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch.* May;430(1):55-63, 1995.

Goldstein DS. Adrenaline and noradrenaline. Dentro de: *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* John Wiley and Sons, Ltd: Chichester. [doi:10.1038/npg.els.0001401]

Gullo F, Ales E, Rosatti B, Lecchi M, Masi A, Guasti L, Cano-Abad MF, Arcangeli A, Lopez AG, Wanke E. ERG K⁺ channel blockade enhances firing and epinephrine secretion in rat chromaffin cells: the missing link to LQT2 related sudden death?. *FASEB J.* Feb;17(2)330-2, 2003.

Guo X, Przywara DA, Wakade TD, Wakade AR. Exocytosis coupled to mobilization of intracellular calcium by muscarine and caffeine in rat chromaffin cells. *J Neurochem.* 67:155-162, 1996.

Hamill, OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FS. Improved patch-clamp recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* 391:85-100, 1981.

Haüsser M, Clark, BA. Tonic synaptic inhibition modulates output pattern and spatiotemporal synaptic integration. *Neuron* 19:665-678.

Haüsser, M, Raman MI, Otis T, Smith SL, Nelson A, du Lac S, Loewenstein Y, Mahon S, Pennartz C, Cohen I, Yarom Y. The beat goes on: Spontaneous firing in mammalian neuronal circuits. *J. Neurosci.* Oct 24(42):9215-9219, 2004.

Hardman JG, Limbird LE, Goodman A. "Goodman and Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics". 9^{na} Edición. McGraw Hill, 2001.

Hollins B, Ikeda SR. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin Cells. *J Neurophys.* Aug 76:2 , 1996.

Horn R, Marty A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole cell recording method. *J Gen Physiol.* Aug; 92(2):145-59, 1988.

Jackson AC, Yao GL, Bean BP. Mechanism of spontaneous firing in dorsomedial suprachiasmatic nucleus neurons. *J. Neurosci.* 24:7985-7998, 2004.

Jensen A. Capitulo 118 pp 2311-38 dentro de "Comprehensive Human Physiology" Vol. 2, Groeger R y Windhorst U, editores. Springer-Verlag de Berlin, Alemania. 1996.

Kim KT, Westhead EW. Cellular responses to Ca²⁺ from extracellular and intracellular sources are different as shown by simultaneous measurements of

cytosolic Ca²⁺ and secretion from chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. Dec 86(24):9881-5, 1989.

Lopez MG, Artalejo AR, García AG, Neher E, García-Sancho J. Veratridine-induced oscillations of cytosolic calcium and membrane potential in bovine chromaffin cells. *J Physiol*. Jan 1;482 (Pt on1):15-27, 1995.

Lynch JW y Barry PH. Action Potentials initiated by single channels opening in a small neuron (rat olfactory receptor). *Biophys J*. 55(4):755-78, 1989.

Nassar- Gentina V, Pollard HB, Rojas E. Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal. *Am J Physiol*. May 254 (5 Pt 1): C675-83, 1988.

Neely A y Lingle CJ. Two components of calcium activated potassium currents in rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol (Lond)*. 453:133-166, 1992.

Neuhaus R, Reber BF, Reuter H. Regulation of bradykinin and ATP-activated Ca²⁺ permeable channels in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J Neurosci*. 11:3984-90, 1991.

Norman AW y Litwack G editores. "Hormones" 2^{da}. Edición. Academic Press, 1997.

Martin RL, Lee JH, Cribbs LA, Perez-Reyes E, Hanck, D. Mibefradil block of T-Type calcium channels. *Pharmacology*. 295(1):302, 2000.

McCormick DA, Huguenard JR. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons. *J Neurophysiol*. 68:1384-1400, 1992.

Malgaroli A, Fesce R, Meldolesi J. Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5-triphosphate elevations but are generated by a caffeine and ryanodine-intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem*. Feb 25;265(6):3005-8, 1990.

Malgaroli A, Meldolesi J. $[Ca^{2+}]_i$ oscillations from internal stores sustain exocytic secretion from the chromaffin cells of the rat. *FEBS Lett*. Jun 3;283(2):169-72, 1991.

Marengo FD y Monck JR. Development and dissipation of Ca^{2+} gradients in adrenal chromaffin cells. *Biophys J*. 79(4):1800-20, 2000.

Marty A, Neher E. Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol*. 367:117-141, 1985.

Mason MJ, Simpson AK, Mahaut-Smith MP, Robinson HPC. The interpretation of current clamp recordings in the cell-attached patch-clamp configuration. *Biophys J*. Jan 88;1:739-750, 2005.

Micheletti M, Brioschi A, Fesce R, Grohovaz F. A novel pattern of fast calcium oscillations points to calcium and electrical activity cross-talk in rat chromaffin cells. *Cell Mol Life Sci*. 62:95-104, 2005.

Moser T. Low-conductance intercellular coupling between mouse chromaffin cells *in situ*. *J Physiol*. Jan 1;506(Pt 1):195-205, 1998.

O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, Burgoyne RD. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO J*. 401-411, 1989.

Oomori Y, Habara Y, Kanno T. Muscarinic and nicotinic receptor-mediated Ca^{2+} dynamics in rat adrenal chromaffin cells during development. *Cell Tissue Res*. 294:109-112, 1998.

Park YB. Ion selectivity and gating of small conductance $Ca(2+)$ activated K^+ channels in cultured adrenal chromaffin cells. *J Physiol*. Dec 15;481(Pt 3):555-70, 1994.

Pennartz,CMA, De Jeu MTG, Bos NPA, Schapp J, Geurtsen AMS. Diurnal modulation of peacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature* 416:126-290 2002

Portbury LA, Chandra R, Groelle M, McMillian MK, Elias A, Herlong JR, Rios M, Roffler-Tarlov S, Chikaraishi DM. Catecholamines act via a beta-adrenergic receptor to maintain fetal rate and heart survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284:H2069-77, 2003.

Raman IM, Bean BP. Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons . *J. Neurosci* 19:1663-1674, (1997)

Raman IM, Guftafson AE, Padgett D. Ionic currents and spontaneous firing in neurons isolated from the cerebellar nuclei. *J Neurosci.* 20:9004-9016, 2000

Rettig J, Neher E. Emerging Roles of presynaptic proteins in calcium triggered exocytosis. *Science.* Oct 289:781-5, 2002.

Rychkov GY, Adams IC, McMillen, Roberts ML. Oxygen-sensing mechanisms are present in the chromaffin cells of the sheep adrenal medulla before birth. *J Physiol* 509.3:887-893, 1998.

Sakmann B, Patlak J, Neher E. Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature*. July 3:286(5768) 71-3, 1980.

Selye H. The physiology and pathology of exposure to stress. A treatise based on the concepts of general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. Montreal Canada, Acta Inc.1950.

Schegel W, Mollard P. Electrical Activity and stimulus-secretion coupling in neuroendocrine cells Capítulo 3, pp 26-32 en "The electrophysiology of Neuroendocrine cells". Scherubl H y Hescheler J, Editores. CRC press, 1995.

Schegel W, Winiger BP, Mollard P, Vacher P, Wuarin F, Zahnd GR, Wollheim CD, Dufy B. Oscillations of cytosolic Ca^{2+} in pituitary cells due to action potentials. *Nature*. Oct 22-28;329(6141):719-21, 1987.

Sherman-Gold, S., Editor. The Axon Guide for electrophysiology and biophysics, laboratory techniques. Capítulo 3. Axon Instruments, Inc., 1993.

Solaro CR, Lingle CJ. Trypsin sensitive, rapid inactivation of a calcium-activated potassium channel. *Science*. Sep 18;257(5077):1694-8, 1992.

Solaro CR, Prakriya M, Ding JP, Lingle CJ. Inactivating and non inactivating Ca^{2+} dependent K^+ current in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*. Sep;15(9):6110-23, 1995.

Taddese A, Bean BP. Subthreshold sodium current from rapidly inactivating sodium channels drives spontaneous firing of tuberomamillary neurons . *Neuron* 33:587-600, 2002.

Thompson RJ, Nurse CA. Anoxia differentially modulates multiple K^+ currents and depolarizes neonatal rat adrenal chromaffin cells. *J Physiol*. 512.2:421-34, 1998.

Verheugen JAH, Vijverberg HPM. Intracellular Ca^{2+} oscillations and membrane potential fluctuations in intact human T-lymphocytes: Role of K^+ channels in Ca^{2+} signaling. *Cell Calcium* 17:287-300, 1995.

Verheugen JAH, Fricker D, Miles R. Non invasive measurements of the membrane potential and GABAergic action in hippocampal neurons. *J Neurosci* Apr 19(7):2546-2555, 1999.

Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature*. Apr:374(6523):640-3, 1995.

