



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA
EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA :
PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES
DE CALCIO TIPO T
Y
PERSISTENTES DE SODIO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

PEDRO DAVID SEGURA CHAMA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“Lo último que uno sabe, es por donde empezar”
BLAS PASCAL.

ESTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ EN EL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

CON EL APOYO DE CONACYT 42662-Q, DGAPA-UNAM IN226403 Y PROYECTO IMPULSA DE CÉLULAS TRONCALES, UNAM.

**A MIS PADRES:
Emilia Chama Castillo
y Pedro Segura Pérez.
Con quienes vivo por
siempre agradecido.**

Con amor, respeto y agradecimiento
A Gabriela Ramírez Ramírez.
Quién me ha apoyado
incondicionalmente y me
inspira a seguir adelante.

A mis queridas hermanas: Isabel, Eva, Carmen, Beatriz, Alma, Blanca y Reyna. Con cariño y agradecimiento.

A mis queridos sobrinos: Joel, Mine, Fanny, Cintli, Octavio, Peter, Ángel, Naomi y Keneth.

A Jaime, David, Eduardo, Luis y Miosés.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Tatiana F., Claudia, Nicolás, Mariana, Luisa, Omar, Adán H., Adán L. Por su ayuda y por los buenos momentos.

A mis amigos: Nicolás, Edith, Martín, Julio, Israel, Daniel, Ariana, Fernanda, Mariana, Graciela, Marlem. Con mucho cariño.

Con infinito agradecimiento al Dr. Arturo Hernández Cruz por darme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio y sobre todo por el apoyo brindado, así como por la comprensión y la tolerancia que me ha tenido.

A los revisores de ésta tesis: Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dra. Maria Luisa Fanjul Peña, Dra. Tatiana Fiordeliso Coll, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y Dr. Adán Hernández Cortés. Gracias por sus oportunas observaciones y por el tiempo dedicado a la revisión de dicho trabajo.

A Diana Millán Aldaco por las excelentes preparaciones de células.

A José Nicolás Jiménez Pérez por el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Las células cromafines de la glándula suprarrenal sintetizan y secretan catecolaminas y se caracterizan por presentar potenciales de acción espontáneos, es decir, no depende de la estimulación por agonista. En células de rata adulta la frecuencia de disparo oscila entre 0.05 y 0.1 Hz mientras que en células de rata recién nacida o fetales la frecuencia de disparo oscila entre 1 y 2 Hz, esto puede estar asociado a que en la etapa adulta solo un 20 % de células cromafines muestran corrientes de calcio tipo T, mientras que células inmaduras de etapa prenatal cerca de 50 % de las células muestran estas corrientes.

El influjo de calcio a través de los canales de calcio tipo T es importante porque puede participar en la despolarización inicial de la célula que permita el disparo de potenciales de acción. Por otra parte, el bloqueo de canales de sodio sensibles a tetrodotoxina produce una disminución parcial de la amplitud de los potenciales de acción espontáneos. No obstante, la actividad eléctrica se mantiene. Esto nos hace pensar que probablemente exista una corriente subumbral en las células cromafines, activada por canales persistentes de sodio, manteniendo a la célula susceptible a despolarizarse.

Debido a que la actividad eléctrica espontánea está implicada en parte de la secreción basal de catecolaminas en estas células, y su desregulación podría conducir a estados de hipertensión e hipotensión, es preciso determinar cuáles son los canales iónicos que se encuentran implicados en la generación de potenciales de acción espontáneos. Por lo cual, este proyecto se enfocó en evaluar la posible contribución de los canales de calcio tipo T y persistentes de sodio a la actividad eléctrica espontánea en las células cromafines de rata.

Para lograr dicho objetivo, se determinó el efecto de bloqueadores específicos para los canales antes mencionados sobre la frecuencia de disparo y la amplitud de la corriente de potenciales de acción espontáneos en células cromafines de rata; registrados extracelularmente mediante la técnica de "Patch-clamp" en modalidad de célula adosada. Nuestros resultados muestran que los canales de calcio tipo T y los canales persistentes de sodio están implicados en la regulación y generación de la frecuencia de disparo de corrientes de potenciales de acción espontáneos en células cromafines de rata.

ÍNDICE

RESUMEN	VIII
ÍNDICE	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La glándula suprarrenal	1
1.2 Células cromafines	3
1.3 Irrigación de la glándula suprarrenal	3
1.4 Inervación de la glándula suprarrenal en humanos	4
1.5 Implicaciones fisiológicas de las catecolaminas	4
1.6 Síntesis de catecolaminas	7
1.7 Secreción de catecolaminas	8
1.8 Propiedades eléctricas de las células cromafines	9
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Canales de Ca²⁺ y de Na⁺ dependientes de voltaje	11
2.2 Actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata	12
2.3 Participación de canales de Ca²⁺ tipo T en actividad eléctrica espontánea	14
2.4 Canales de Ca²⁺ tipo T en células cromafines	14

2.5 Participación de los canales persistentes de Na⁺ en actividad eléctrica espontánea	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVO GENERAL	19
5.1 Objetivos particulares	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Cultivo celular	20
6.2 Registro extracelular de corrientes del potencial de acción en células cromafines individuales	21
6.3 Preparación de soluciones	24
6.4 Análisis de datos	25
7. RESULTADOS	27
7.1 Participación de canales de Ca²⁺ tipo T en corrientes del potencial de acción espontáneos en células cromafines de rata en cultivo	27
7.2 Efecto de la incubación con AMPc sobre la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata en cultivo	30
7.3 Efecto de TTX sobre la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata en cultivo	33

7.4 Efecto del bloqueo de canales persistentes de Na⁺ sobre la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata	35
8. DISCUSIÓN	40
8.1 Los canales de Ca²⁺ tipo T participan en la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines de rata	40
8.2 Disminución de la actividad eléctrica espontánea en células cromafines tratadas con AMPc	41
8.3 El bloqueo de los canales de Na⁺ con TTX no detiene la generación de la actividad eléctrica espontánea	43
8.4 Canales persistentes de Na⁺ participan en la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata	43
9. CONCLUSIONES	46
10. REFERENCIAS	47

1. INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso autónomo (SNA) controla las funciones vitales en los mamíferos, modula la actividad de los sistemas cardiovascular, respiratorio, digestivo y urogenital. El SNA contacta a las glándulas endocrinas, las cuales vierten sus secreciones (hormonas) al torrente sanguíneo, donde viajan hasta llegar a sus órganos diana.

Una de las glándulas que es regulada por el SNA es la glándula suprarrenal; a la unidad formada por ambos componentes se le ha considerado parte del “eje simpato-adrenal”, el cual se encarga de mantener la homeostasis durante la exposición a estímulos extremos (Landsberg y Young, 1992).

Las células que conforman a la médula de la glándula se llaman células cromafines, que por sus características se consideran como un valioso modelo neuronal (Tischler, 2002).

Las células cromafines de rata se caracterizan por presentar actividad eléctrica de manera espontánea, la cual será objeto de estudio en el presente trabajo.

1.1 La glándula suprarrenal

Las glándulas suprarrenales o glándulas adrenales son dos pequeñas estructuras de forma piramidal situadas sobre la parte superior de cada riñón (Fig. 1) (Tortora y Grabowski, 2002). En los mamíferos, la glándula suprarrenal o glándula adrenal se compone de dos partes bien diferenciadas anatómica y funcionalmente, la corteza y la médula. La glándula se encuentra recubierta por tejido adiposo y una cápsula de tejido conectivo adherido al riñón y se caracteriza por presentar una gran vascularización (Tortora y Grabowski, 2002; Verdugo, 2005).

La corteza adrenal se divide en tres capas o estratos denominadas, desde la superficie hacia el interior: 1) zona *glomerulosa*, sus células se encargan de sintetizar y secretar mineralocorticoides que tienen efectos en la homeostasis del agua y electrolitos, en particular de los minerales sodio y potasio; 2) zona *fasciculata*, sus células sintetizan y secretan principalmente glucocorticoides que tienen efectos en la homeostasis de la glucosa, entre otras funciones, y 3) zona *reticularis*, sus células sintetizan y secretan pequeñas cantidades de andrógenos débiles que tienen efectos masculinizantes.

Todas estas hormonas son indispensables para la vida, ya que la deficiencia de estas hormonas adrenocorticales es causa de muerte por deshidratación y desequilibrio electrolítico (Tortora y Grabowski, 2002; Verdugo, 2005).

La médula adrenal está formada de células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas (Coupland, 1989). La médula se define como un ganglio simpático cuyas neuronas postganglionares no inervan tejido alguno sino que, en respuesta a diversos estímulos vierten sus productos de secreción al torrente circulatorio con lo que sus neurotransmisores, catecolaminas, péptidos o purinas se van a comportar conceptualmente como hormonas (Trifaró, 2002).

Las dos hormonas principales de la médula suprarrenal son la adrenalina y noradrenalina, también denominadas epinefrina y norepinefrina, respectivamente. A diferencia de las hormonas adrenocorticales, las medulares no son esenciales para la vida (Tortora y Grabowski, 2002).

La médula adrenal y el sistema nervioso simpático forman una unidad anatómica y funcional, a la cual se le denomina sistema “simpato-adrenal” que se encarga de soportar el estrés durante la exposición a estímulos extremos (Landsberg y Young, 1992).

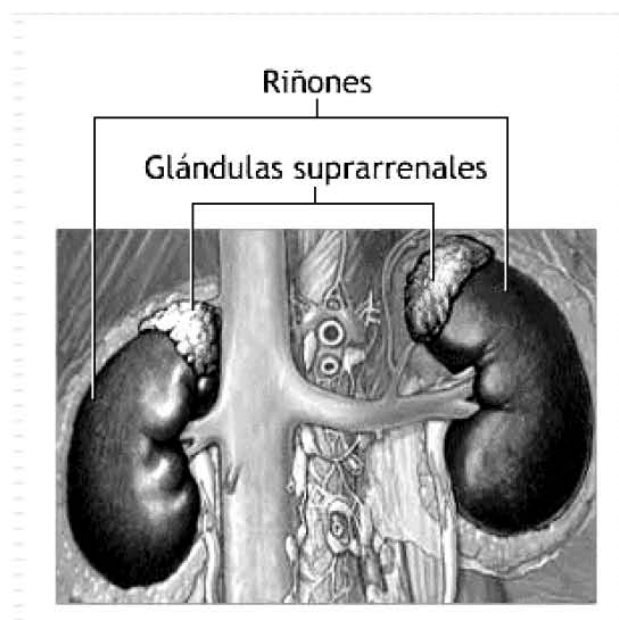


Fig. 1 Las glándulas adrenales se ubican, cada una, en la parte superior de cada riñón.

1.2 Células Cromafines

Las células cromafines (del griego *chroma* = color y del latín *affinis* = afín). Se denominan así por la alta afinidad que tienen sus gránulos para teñirse con sales de cromo (Coupland, 1989), embriológicamente derivan del neuroectodermo, presentan innervación simpática preganglionar y tienen capacidad para sintetizar, almacenar y secretar catecolaminas.

En función de la catecolamina que secretan se distinguen fundamentalmente dos tipos de células cromafines, adrenérgicas y noradrenérgicas, las cuales se disponen en grupos de varias células rodeando estructuras vasculares. La diferencia bioquímica entre estos dos tipos celulares es debida a la presencia, en las células adrenérgicas, de una enzima adicional, la feniletanolamina N-metil transferasa (PNMT, por sus siglas en inglés) que convierte la noradrenalina en adrenalina. Ver Fig 2. (Trifaró, 2002).

Morfológicamente la diferencia más llamativa es que los gránulos que contienen a las catecolaminas en las células adrenérgicas son de mayor tamaño que en las noradrenérgicas, teniendo un contenido más homogéneo y una mayor densidad de material, esto en observaciones realizadas a nivel ultraestructural después de la fijación celular (Coupland, 1989).

1.3 Irrigación de la glándula suprarrenal en humanos

El sistema arterial que irriga a las glándulas adrenales lo constituyen las arterias suprarrenal superior, media e inferior, que son, respectivamente, ramas de la aorta, de la arteria diafragmática inferior y de la arteria renal. Ocasionalmente reciben ramas de las intercostales y de la arteria ovárica o de la espermática.

La circulación dentro de la glándula adrenal es bastante compleja: se realiza mediante un sistema portal convergente formado por pequeñas arterias que se dirigen de la cápsula a la corteza y que constituyen una red de arteriolas y capilares; esta red se continúa con un sistema sinusoidal que se extiende radialmente hacia lagunas venosas situadas en la médula. Las vénulas se reúnen en una gran vena central que atraviesa la glándula; en el lado derecho confluye hacia la vena cava inferior y en el lado izquierdo lo hace directamente sobre la vena renal del mismo lado.

Este sistema de vascularización permite la llegada de concentraciones elevadas de glucocorticoides a la médula suprarrenal, los cuales favorecen la síntesis de la enzima exclusiva de la médula suprarrenal, la PNMT (Tortora y Grabowski, 2002;

Grimaldo, 1997). A esta múltiple aferencia arterial se opone una sola vena eferente, la vena adrenolumbar o vena medular central, que a su vez recoge parte del drenaje del retroperitoneo (Grimaldo, 1997).

1.4 Inervación de la glándula suprarrenal en humanos

En relación con su tamaño, las glándulas suprarrenales tienen una inervación muy rica; en un individuo adulto, del peso total de la glándula aproximadamente un 90 % corresponde a la corteza, mientras que el resto a la médula (Verdugo, 2005).

La inervación simpática de la médula suprarrenal proviene de los segmentos torácicos 10, 11 y 12, así como del 1º lumbar, cuyas fibras preganglionares se dirigen al ganglio preaórtico y sin hacer sinapsis, emergen como fibras aparentemente postganglionares que se dirigen hacia la médula suprarrenal. También recibe inervación de un plexo de origen cortical que penetra a la médula formando verdaderos haces, que en su interior se ramifican profusamente y forman terminales sinápticas alrededor de las células cromafines. Como en los ganglios simpáticos, el mediador químico preganglionar que estimula la secreción de catecolaminas es la acetilcolina (ACh, por su nombre en inglés). (Trifaró, 2002; Tortora y Grabowski, 2002).

1.5 Implicaciones fisiológicas de las catecolaminas

Las catecolaminas afectan a todos los tejidos participando con otras hormonas y con el sistema neuronal en la regulación de múltiples procesos biológicos. La mayor parte de las respuestas a diferentes situaciones de estrés están determinadas por los productos de secreción de la médula suprarrenal.

Los receptores que median los efectos de las catecolaminas se denominan receptores adrenérgicos, de los cuales existen dos familias, α y β . Los receptores de la familia α presentan mayor afinidad por noradrenalina que por adrenalina, mientras que los receptores de la familia β presentan mayor afinidad por la adrenalina que por noradrenalina (Grimaldo, 1997; Verdugo, 2005).

Los estímulos que promueven la secreción de catecolaminas pueden provenir de un incremento de la actividad de los nervios esplácnicos, liberadores de acetilcolina, o a partir de estímulos químicos por vía hemática.

Entre los primeros se pueden mencionar las situaciones de miedo y ansiedad, la hipoglucemia, la hipotensión o la hipotermia. Mientras que por vía hemática pueden

llegar sustancias como la histamina y la bradicinina que son liberadas en situaciones de alergia, o la angiotensina II liberada en situaciones de hipotensión (Verdugo, 2005).

Las catecolaminas liberadas por los distintos estímulos pueden actuar en diferentes órganos blanco. En la tabla 1 se muestran los efectos que tienen la catecolaminas en diferentes órganos.

La secreción de catecolaminas inducidas por cualquier estímulo cesa al cabo de unos minutos aunque el estímulo se mantenga, esta desensibilización se interpreta como una protección del organismo frente a una liberación excesiva de catecolaminas que puede ser potencialmente letal.

Las catecolaminas son eliminadas de los diferentes compartimientos celulares por diversos mecanismos. En los espacios sinápticos del sistema nervioso central (SNC) y en el líquido intersticial de los axones de las neuronas simpáticas son eliminadas por medio de su recaptura dentro de las terminales nerviosas y son degradadas intracelularmente por la oxidasa de monoaminas (MAO, por sus siglas en inglés). Las catecolaminas de origen neural o endocrino son degradadas por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) en las propias células diana (Verdugo, 2005).

Tabla 1. Efectos fisiológicos de la adrenalina, noradrenalina o ambas.
(Tomado de: Drucker C. Fisiología médica. Editorial El Manual Moderno, México, 2005)

Órgano blanco	Tejido o sistema	Receptor	Respuesta
Corazón	Nodo seno-auricular	β_1	Taquicardia
	Sistema de conducción		Aumenta velocidad de conducción
	Ventrículos		Aumenta contractilidad y velocidad de conducción
Arteriolas	Coronaria	α_1	Vasoconstricción
	Músculo esquelético	α_1	Vasoconstricción
		β_2	Vasodilatación
	Cerebrales	α_1	Ligera vasoconstricción
	Del área esplácnica (gastrointestinales y renales)	α_1	Vasoconstricción
	Piel y mucosas	α_1	Vasoconstricción (palidez)
Venas		α_1	Vasoconstricción (aumenta en retorno venoso)
Pulmón	Músculo bronquial	β_2	Broncodilatación
Metabolismo	Músculo	β_2	Estimula la gluconeogénesis e inhibe síntesis de glucógeno
	Hígado	β_2	Estimula la glucogenólisis e inhibe la síntesis de glucógeno
	Adipocitos	β_3	Lipólisis
Islotes pancreáticos	Células β	α_2	Inhibe la secreción de insulina
		β_2	Estimula la secreción de insulina
	Células α	β_2	Estimula la secreción de glucagón
Tracto intestinal	Músculos	α_1, α_2	Disminuye la motilidad
	Células secretoras	α_2	Inhibe la secreción de jugos digestivos
Glándulas salivales		β_1	Estimula la secreción de moco
Piel	Glándulas sudoríferas	α_1	Sudoración adrenérgica
	Músculo pilomotor	α_1	Piloerección
Ojo	Músculo dilatador de la pupila	α_1	Midriasis (dilatación pupilar)
	Músculo ciliar	β_2	Relajación para visión lejana
	Humor acuoso	β_2	Aumenta la producción activan el cuerpo ciliar
Órganos sexuales masculinos		α_1	Eyaculación
Útero		β_2	Relajación en útero preñado y no preñado
		α_1	Contracción en útero preñado

1.6 Síntesis de catecolaminas

Las vesículas o gránulos cromafines constituyen los organelos más representativos y abundantes en las células cromafines y es donde se almacenan los productos de secreción, su diámetro oscila entre los 250 y 450 nm (Grimaldo, 1997).

Se ha descrito la presencia de varios tipos de nucleótidos cíclicos en los gránulos cromafines. Casi un 80% de todo el ATP presente en una célula cromafin se encuentra en los gránulos (Verdugo, 2005).

Las catecolaminas dopamina, noradrenalina y adrenalina son derivados de L-tirosina, este aminoácido puede provenir de la dieta o bien de la transformación de la fenilalanina en el hígado y que circula en plasma a una concentración de 1 a 1.5 mg/dL. Esta molécula es catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa para obtener dihidroxifenilalanina (Dopa). La dopa descarboxilasa es una enzima piridoxidodependiente que cataliza la dopa en dopamina. La dopamina es catalizada por la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que convierte la dopamina en noradrenalina. Finalmente, la adrenalina es sintetizada a partir de la noradrenalina por la acción de la enzima PNMT (Fig. 2).

Se considera que alrededor del 80% de la secreción de catecolaminas llevada a cabo por la médula suprarrenal corresponde a adrenalina, mientras que alrededor del 20% corresponde a noradrenalina (Grimaldo, 1997; Verdugo, 2005).

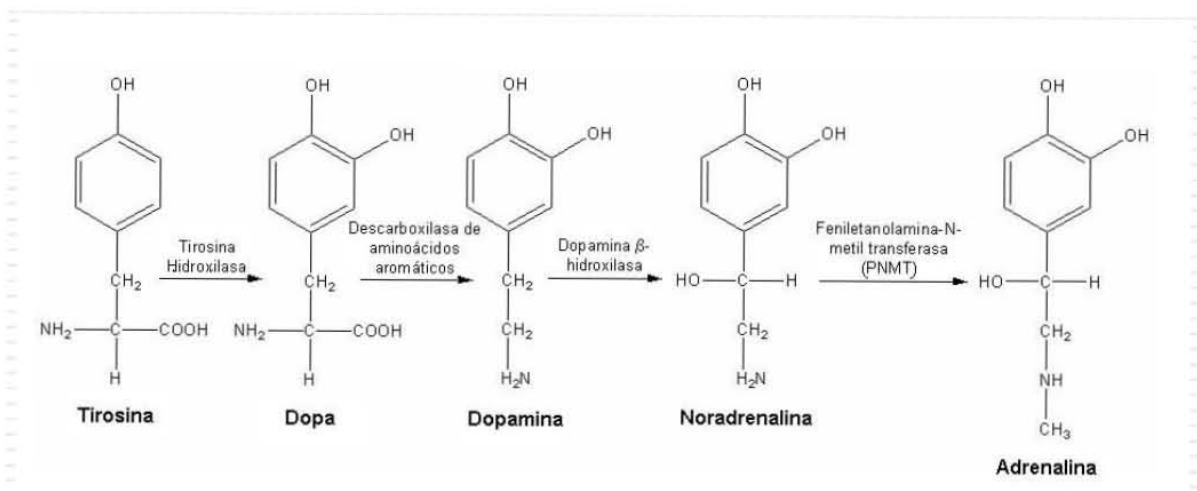


Fig. 2. Vía biosintética de las catecolaminas. La conversión de dopamina en noradrenalina se lleva a cabo dentro de las vesículas de secreción. (Modificado de: Drucker C. Fisiología médica. Editorial El Manual Moderno, México, 2005)

1.7 Secreción de catecolaminas

Se postula que el funcionamiento de la glándula suprarrenal depende de la respuesta a estímulos extremos o insultos metabólicos que incrementan la actividad neuronal recibida por la médula, ocasionando la secreción de catecolaminas al torrente sanguíneo.

Al igual que las vesículas sinápticas de las neuronas, los gránulos que contienen las catecolaminas en las células cromafines descargan sus contenidos al torrente sanguíneo por medio de la exocitosis (Douglas, 1968).

En todas las células endocrinas, la secreción de hormonas incrementa en respuesta a un aumento en la concentración de calcio libre intracelular $[Ca^{2+}]_i$, provocado por la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares provocada por sus secretagogos o por la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana celular (Schlegel y Mollard, 1995).

La secreción de las células cromafines se lleva a cabo por la acción que ejerce la acetilcolina (ACh) a través de dos tipos de receptores, los receptores de tipo nicotínico (nAChR) y los receptores de tipo muscarínico (mAChR).

Los nAChR se consideran canales catiónicos no selectivos, que al ser activados por ACh, permiten el paso de iones Na^+ K^+ y Ca^{2+} (Sakmann, 1980; Role, 1992; Sargent, 1993). La activación de esta corriente en una célula en reposo produce una despolarización de la membrana llamada potencial post-sináptico excitatorio (PSE) la cual, a su vez, si alcanza o sobrepasa el umbral de disparo de potencial de acción, puede generar uno o más potenciales de acción.

Los mAChR son receptores transmembranales acoplados a proteínas G; su activación promueve la producción de 1,4,5-Inositol trifosfato (IP_3) y la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ modula la actividad de muchas proteínas intracelulares incluyendo a canales iónicos.

La actividad conjunta de ambos tipos de receptores produce un incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción. En condiciones fisiológicas, la ACh promueve *dos fases* donde intervienen ambos receptores. La *primera fase* es un aumento rápido y transitorio de la frecuencia de disparo de potenciales de acción, que se debe a la despolarización provocada por la activación de los nAChR. Este incremento en la frecuencia de disparo aumenta la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV). Por lo tanto, el aumento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ en microdominios cercanos a las vesículas de catecolaminas ancladas en la membrana,

promueve la fusión de dichas vesículas a la membrana para liberar sus contenidos (Becherer, 2004). En la *segunda fase*, la frecuencia de disparo de potenciales de acción es menor en relación a la frecuencia de la primera fase, pero se mantiene la actividad eléctrica debido a la activación de los mAChR, que producen incrementos más lentos y periódicos de la $[Ca^{2+}]_i$ (Guo X., 1996).

1.8 Propiedades eléctricas de las células cromafines

En las células cromafines se expresa una gran variedad de canales iónicos que originan sus potenciales de acción (ver Fig. 3). Su potencial de reposo se mantiene alrededor de los -60 mV (Hollins e Ikeda, 1996).

El potencial de acción de las células cromafines inicia cuando un PSE despolariza a la célula, alcanzando el umbral de disparo y promoviendo la activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje. La despolarización continúa hasta llegar a un pico máximo alrededor de los 30 mV (Artalejo, 1995; Hollins, e Ikeda, 1996). En células cromafines fetales de rata existen también canales de calcio tipo T, que al activarse contribuyen a la despolarización inicial Fig 3. (Hollins e Ikeda, 1996).

Una vez que el potencial de acción sobrepasa el punto en que el voltaje de membrana (V_m) es igual a cero, los canales activos son los canales de Ca^{2+} de alto umbral (P, N, L) Fig. 3, que se activaron por el efecto de la despolarización provocada por los canales de Na^+ ; en esta fase del potencial se controla el influjo de calcio a la célula, y en consecuencia, la secreción de catecolaminas.

La repolarización se da cuando los canales de Na^+ se inactivan, mientras que la despolarización gradualmente activa a los canales de K^+ dependientes de voltaje y los canales de Ca^{2+} permanecen activados. En esta fase se activa la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} de tipo BK, que son sensibles a cambios en el potencial de membrana como a cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ Se considera que esta actividad controla la duración del potencial de acción, así como el intervalo de tiempo entre disparos en el tren de potenciales de acción Fig. 3.

La última fase del potencial es la hiperpolarización y depende de la actividad de los canales BK y de los SK, que presentan mayor sensibilidad al Ca^{2+} que los BK Fig. 3. (Schlegel y Mollard, 1995).

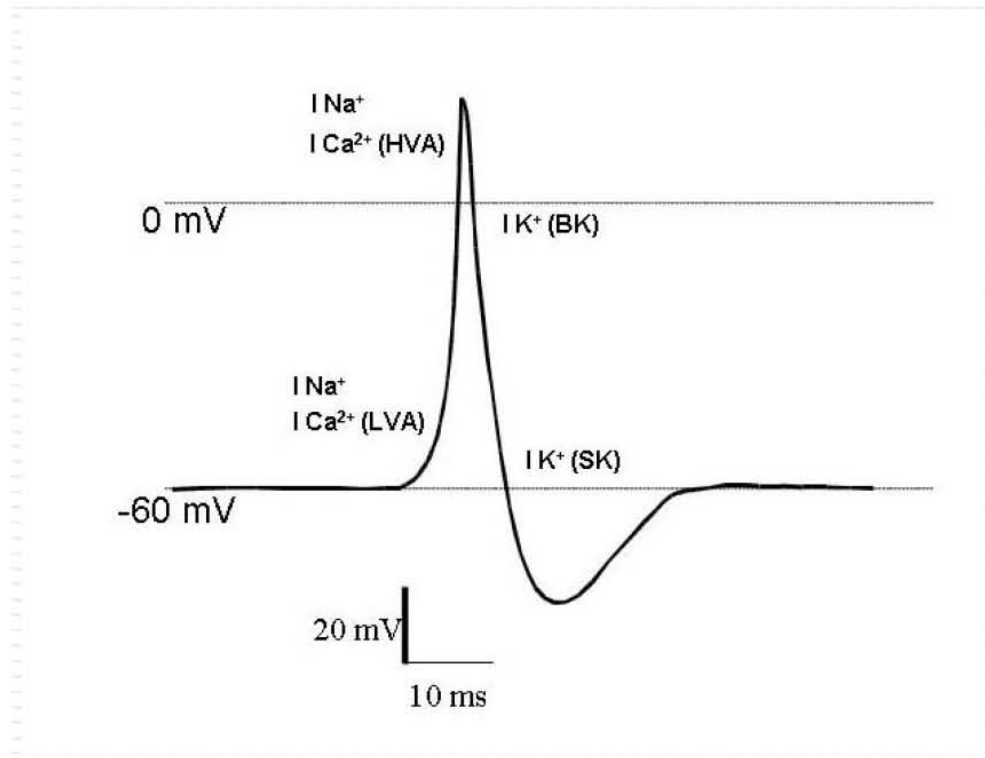


Fig. 3. Representación de un potencial de acción y las corrientes que lo generan. (Modificado de: Escobedo. Tesis de licenciatura, 2006)

2. ANTECEDENTES

Todas las células poseen una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática (potencial de membrana, V_m), que en el reposo es negativo del lado citosólico respecto del medio extracelular. En las células cromafines el potencial de reposo se mantiene entre los -60 y -40 mV (Hollins e Ikeda, 1996).

La diferencia en la distribución de cargas eléctricas permite a las células generar actividad eléctrica espontánea o en respuesta a estimulación (Aidley, 1989). Las corrientes iónicas fluyen de un lado a otro de la membrana celular, a través de poros proteicos que atraviesan la membrana, llamados canales iónicos (Hille, 2001).

Los canales iónicos también participan en diferentes procesos fisiológicos relacionados con la secreción de hormonas y neurotransmisores, contracción muscular, regulación metabólica y expresión génica (Catterall, 2000; Ogata, 2002).

En las células cromafines están presentes diferentes tipos de canales iónicos, entre ellos, canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .

Debido a las similitudes estructurales y funcionales que existen entre canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ y principalmente por compartir la característica de ser sensibles al voltaje, se agrupan en la superfamilia de canales dependientes de voltaje (Hille, 2001).

2.1 Canales de Ca^{2+} y de Na^+ dependientes de voltaje

Inicialmente, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) se clasificaron en consideración del voltaje que se requiere para activarlos; en la década de los 80^{ss} se logró identificar dos clases de canales de Ca^{2+} , los de bajo umbral de activación o LVA (Low Voltage Activated) que presentan corrientes transitorias (tipo T) y los de alto umbral de activación o HVA (High Voltage Activated) que presentan corrientes de larga duración (tipo L) y otros tipos de corriente llamados N, P, Q y R (Bean, 1989; Carbone y Lux, 1984; Matteson y Armstrong, 1986).

Recientemente se estableció una nomenclatura similar a la que se utiliza en otras familias de canales dependientes de voltaje como los de Na^+ y K^+ . El primer término se refiere al ión permeable, seguido del estímulo principal para la apertura y cierre del canal y dos números separados por un punto, el primero indica la familia de proteínas y el segundo a la isoforma particular. Ejemplo, $\text{Ca}_v3.1$: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo T codificado por la subunidad $\alpha 1$ G (Yamakage, 2002).

En adelante, nos referiremos a los canales de Ca^{2+} por el tipo de corriente que presentan; por lo cual, en una parte de este trabajo nos enfocaremos a los canales de Ca^{2+} tipo T.

Por otra parte, otra familia de canales, los canales de Na^+ dependientes de voltaje (CSDV) están presentes en las membranas de células excitables y son esenciales para la generación de potenciales de acción (Ogata, 2002). Aunque la función esencial de los CSDV es generar un potencial de acción en células excitables, recientemente se han publicado trabajos en los que se menciona que influyen en la actividad eléctrica subumbral en neuronas por medio de una corriente de Na^+ persistente o resurgente; esto ha marcado un nuevo concepto sobre la integración de la actividad de canales de Na^+ en el disparo de potenciales de acción neuronales (Delmas, 1997; Ogata, 2002). Por éstas razones, se le ha dado bastante atención al estudio de corrientes subumbrales de Na^+ , debido a que se considera como un factor clave en la regulación del disparo de actividad eléctrica repetitiva (Crill, 1996).

Actualmente, a este tipo de corrientes subumbrales se les ha denominado: “Corriente de Na^+ persistente” (I_{NaP}), que mantiene el potencial de membrana cerca del umbral de disparo del potencial de acción, incrementando la posibilidad de disparar un potencial de acción seguido de otro (Van Goor, 2001).

2.2 Actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata

Se considera actividad eléctrica espontánea en neuronas, al disparo de potenciales de acción en ausencia de estimulación sináptica y depende de una interacción entre las corrientes de la célula. Estas corrientes promueven una despolarización que sobrepasa el umbral de disparo, se genera uno o más potenciales de acción y se regresa a valores cercanos al potencial de reposo, para volver a despolarizarse de nuevo y comenzar de nuevo el ciclo en ausencia de estímulos externos.

Entre las características que presentan las células cromafines es que aproximadamente entre 50 y 85 % de ellas disparan potenciales de acción de manera espontánea. Esto se ha observado tanto en rebanadas de la glándula como en células aisladas en cultivo primario (Nassar G, 1988; Micheletti, 2005). Estos potenciales de acción ocurren de manera arrítmica, tanto en células cromafines de rata adulta (Brandt, 1976), en células de ratas recién nacidas y en células cromafines de ratas en etapas fetales (Escobedo, 2006). Aunado a esto, también se ha reportado que entre el 50 y 85

% de células cromafines de rata exhiben fluctuaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$ (Malgaroli, 1990, Micheletti, 2005).

Las células cromafines de rata en etapa fetal y durante los primeros días después del nacimiento, presentan tanto actividad eléctrica espontánea como oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$, las cuales se presentan con mayor frecuencia en las células de rata recién nacida que en las fetales (Escobedo, 2006).

En las células cromafines de rata la conexión entre la actividad eléctrica espontánea y la generación de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ no es tan clara como en otros tipos celulares (gonadotropos, lactotropos y neuronas) donde estas dos formas de actividad se correlacionan perfectamente (Van Goor, 1999; Schlegel, 1987). En este trabajo nos enfocaremos únicamente a estudiar la actividad eléctrica espontánea de estas células.

El origen de los potenciales de acción en las células cromafines de rata no es claro, debido a que existen reportes en donde se menciona que los potenciales de acción espontáneos en estas células se deben a la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje, sin embargo, al ser bloqueados con 1 y 6 μM de tetrodotoxina (TTX) no se eliminan por completo; concluyendo que la porción insensible a TTX que mantiene la generación de potenciales de acción se genera por la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Brandt, 1976; Kidokoro, 1980).

En 1996, Hollins e Ikeda observaron que la presencia de TTX o Cd^{2+} como bloqueadores de canales de Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje, respectivamente, no previene el disparo de potenciales de acción en estas células. En presencia de 100 nM de TTX, los potenciales de acción permanecen, aunque su amplitud disminuye. A estos potenciales de acción que persisten en presencia de TTX, los atribuyen a la actividad de los CCDV. Sin embargo, al aplicar 500 μM de Cd^{2+} como bloqueador no selectivo de CCDV y después de reemplazar el Ca^{2+} del medio extracelular por Mg^{2+} , se pueden observar potenciales de acción espontáneos aunque disminuidos en su frecuencia de disparo y amplitud respecto a condiciones control.

2.3 Participación de canales de Ca^{2+} tipo T en la actividad eléctrica espontánea

En estudios realizados en diversos tipos de neuronas, se ha reportado que en la despolarización inicial que permite a la célula alcanzar el umbral de disparo, participan las corrientes de Ca^{2+} tipo T. El influjo de Ca^{2+} a través de estos CCDV es importante porque puede participar en la despolarización inicial de la célula y simultáneamente actuar como un mensajero intracelular (Huguenard, 1996; Yamakage, 2002).

En las neuronas del tálamo, la despolarización depende de la activación de canales de Ca^{2+} tipo T, los cuales producen espigas de bajo umbral, las que a su vez promueven la generación de potenciales de acción mediados por canales de Na^+ dependientes de voltaje, ya sea en forma de ráfaga o de manera oscilatoria (Huguenard, 1992, 1996, Pérez-Reyes 2003). Cuando a las neuronas de tálamo se les trata con el bloqueador de canales de Na^+ dependientes de voltaje, 1 μM de TTX, se bloquea la fase rápida del potencial de acción, aislándose la espiga de bajo umbral con características de activación e inactivación lenta debida a los canales de Ca^{2+} tipo T (Huguenard, 1992, 1996).

Numerosos estudios han demostrado que espigas de bajo umbral se deben a conductancia a través de canales de Ca^{2+} tipo T, debido a que no se observan en ausencia de Ca^{2+} extracelular y se bloquean con la aplicación de cationes divalentes como Ni^{2+} y Co^{2+} (Hernández-Cruz y Pape, 1989; Chevalier, 2006).

2.4 Canales de Ca^{2+} tipo T en células cromafines

Estudios realizados por el grupo de Hollins e Ikeda (1996) demostraron que solo un 20 % de las células cromafines de rata adulta presenta corriente de Ca^{2+} tipo T. En cambio, en la etapa prenatal (E19-E20) cerca del 50 % de las células muestran corrientes de Ca^{2+} de bajo umbral tipo T (Bournaud, 2001) la cual, no obstante, es insuficiente para provocar secreción de catecolaminas. Esta característica puede estar relacionada con la frecuencia de disparo de la actividad eléctrica espontánea que presentan las células, ya que en células de rata adulta la frecuencia de disparo reportada es de entre 0.05 y 0.1 Hz (Brandt, 1976) mientras que en células de rata recién nacida o fetales la frecuencia de disparo oscila entre 1 y 2 Hz (Escobedo 2006).

Por otra parte, el grupo de Emilio Carbone (Novara, 2004; Giacippoli, 2004) ha demostrado recientemente que la incubación de células cromafines de rata adulta con análogos de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC, por sus siglas en inglés) permeables a la membrana, promueve una sobreexpresión de canales de Ca^{2+} tipo T, específicamente la subunidad $\text{Ca}_v3.2$. Estos nuevos canales se incorporan a la maquinaria de secreción de la célula y participan en la secreción de catecolaminas, dado que ésta se inhibe con la aplicación de Ni^{2+} , el cual a bajas concentraciones, se considera un bloqueador selectivo de $\text{Ca}_v3.2$ (Lee *et al.*, 1999). Las células tratadas con AMPC incrementan la respuesta secretora, la cual se podía inducir a despolarizaciones muy bajas (-50, -40 mV) debido a que el reclutamiento de canales de Ca^{2+} tipo T disminuye el umbral de excitación durante el disparo de potencial de acción (Novara, 2004; Giacippoli, 2004). Nosotros consideramos que una vez disminuido el umbral de excitación de las células incubadas con AMPC por el reclutamiento de canales de Ca^{2+} tipo T, se facilitará el disparo de potenciales de acción espontáneos.

En base a esto, creemos que los canales de calcio tipo T pueden estar involucrados en la generación de actividad eléctrica espontánea.

2.5 Participación de los canales de Na^+ persistentes en la actividad eléctrica espontánea

En diferentes trabajos realizados en células cromafines se ha demostrado que el bloqueo de canales de Na^+ sensibles a TTX produce una disminución parcial de la amplitud de los potenciales de acción espontáneos. No obstante, la actividad eléctrica se mantiene a diferentes concentraciones aplicadas, 1, 3 y 6 μM de TTX (Nassar G, 1998; Hollins e Ikeda, 1996). Esto nos hace pensar que probablemente exista una corriente subumbral en las células cromafines activada por canales de Na^+ persistentes, manteniendo a la célula susceptible a despolarizarse.

Por otro lado, se ha reportado que la corriente subumbral de Na^+ persistente que poseen las neuronas de hipocampo es responsable de la generación de actividad rítmica (Jinno, 2003). También se ha demostrado que una corriente de Na^+ persistente es necesaria para la producción de potenciales de acción espontáneos en los lactotropos en cultivo (Sankaranarayanan y Simasko 1996), y el grupo encabezado por Beurrier (2000) demostró que si bien, la actividad eléctrica espontánea de las neuronas de núcleo

subtalámico de rata es sensible a TTX, la corriente de Na^+ persistente explica la despolarización que se genera después de la hiperpolarización.

En los casos en los que se atribuye que la corriente de Na^+ persistente está implicada en la actividad eléctrica espontánea, se debe a que dicha corriente mantiene al potencial de membrana cerca del umbral del potencial de acción, aumentando la posibilidad de disparo de un potencial de acción seguido de otro (Van Goor, 2001).

Se ha considerado que los canales de Na^+ resistentes a TTX (que en realidad no son insensibles a TTX, lo que sucede es que solo se bloquean con concentraciones de 1 μM en adelante) son quienes generan la I_{NaP} debido a que presentan inactivación lenta. A los canales que producen la I_{NaP} se les ha denominado: canales de Na^+ persistentes resistentes a TTX (Li, 2007; Stafstrom, 2007) o canales de Na^+ persistentes (St-John, 2007). En este trabajo de tesis nos vamos a referir a ellos como canales de Na^+ persistentes.

3. JUSTIFICACIÓN

Las conductancias que permiten el disparo de potenciales de acción en células cromafines ya han sido estudiadas por numerosos grupos de investigación. No obstante, aun falta por esclarecer qué factores son los que promueven la generación de potenciales de acción espontáneos en dichas células.

Debido a que la actividad eléctrica espontánea está implicada en parte de la secreción basal de catecolaminas en estas células, y su desregulación podría conducir a estados de hipertensión e hipotensión, es preciso determinar cuáles son los canales iónicos que se encuentran implicados en la generación de potenciales de acción espontáneos. Por otro lado, un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la actividad eléctrica espontánea nos permitiría elucidar el origen de las oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$ y estudiar su repercusión en la secreción de catecolaminas.

Debido a que la actividad eléctrica espontánea se mantiene a pesar de que los canales de Na^+ se han bloqueado con TTX; es posible que los canales de Ca^{2+} tipo T que se activan a potenciales más hiperpolarizantes que los canales HVA, sean los orquestadores de la generación de la actividad eléctrica espontánea, tal y como se ha visto en neuronas del tálamo.

Pero por otra parte, también es posible que se encuentren canales de Na^+ persistentes activos después del disparo de un potencial de acción, permitiendo suficiente entrada de Na^+ a la célula como para despolarizar la membrana y generar nuevamente un potencial de acción.

Debido a que la posible participación de los canales de Ca^{2+} tipo T y los canales de Na^+ persistentes en la generación de potenciales de acción espontáneos de las células cromafines no se ha estudiado hasta ahora. Este proyecto está enfocado a evaluar la posible contribución de ambos factores a la actividad eléctrica espontánea en las células cromafines de rata.

4. HIPÓTESIS

En base a los antecedentes mencionados consideramos que los resultados que podemos obtener son los siguientes:

- Si al bloquear los canales de Na^+ la actividad eléctrica espontánea se mantiene, el bloqueo farmacológico de los canales de Ca^{2+} tipo T debería detener la generación de potenciales de acción espontáneos, si es que estos canales están involucrados.
- Si el reclutamiento de un mayor número de canales de Ca^{2+} tipo T, luego de la incubación de células cromafines con AMPc, disminuye el umbral de disparo para generar potenciales de acción, entonces la frecuencia de disparo de los potenciales de acción espontáneos se incrementará con este tratamiento.
- Si los canales de Na^+ persistentes mantienen en las células cromafines el potencial de membrana cerca del umbral de disparo para generar actividad eléctrica espontánea, entonces el bloqueo de dichos canales debería frenar la generación de potenciales de acción espontáneos.

5. OBJETIVO GENERAL

El Objetivo General de este trabajo de tesis es estudiar la participación de los canales de Ca^{2+} tipo T y de los canales de Na^+ persistentes en el origen de la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines de rata.

5.1 Objetivos Particulares

- Determinar la existencia de espigas de bajo umbral bloqueando la fase rápida de los potenciales de acción espontáneos mediante la aplicación de TTX.
- Corroborar si el bloqueo de canales de Na^+ con TTX detiene la generación de potenciales de acción espontáneos de las células de rata recién nacida.
- Determinar si la aplicación de Mibefradil, un bloqueador específico de canales de Ca^{2+} tipo T, inhibe la generación de actividad eléctrica espontánea.
- Determinar si la sobreexpresión de canales de Ca^{2+} tipo T mediante la incubación a corto plazo de células cromafines con AMPc afecta la frecuencia de disparo y la amplitud de la espiga de potenciales de acción espontáneos.
- Determinar la participación de canales de Na^+ persistentes en la generación de potenciales de acción espontáneos a través de la aplicación de bloqueadores específicos como Fenitoína, Vinpocetina y Riluzole.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

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 lo estipulado por la Norma Oficial Mexicana (NOM062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

6.1 Cultivo celular

Los cultivos de células cromafines de ratas recién nacidas fueron preparados de acuerdo con el siguiente protocolo: las ratas recién nacidas de una camada se separaron de la madre en los días postnatales 3 a 5 y se anestesiaron por hipotermia para poder diseccionar las glándulas adrenales bajo el microscopio estereoscópico. Las glándulas disecadas fueron mantenidas en medio HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) frío. Después de terminada la fase de colección, las glándulas fueron lavadas cuatro veces con HBSS frío y colocadas en un tubo de centrifuga para ser digeridas enzimáticamente por incubación con Colagenasa tipo I (Worthington, Inc., Lakewood, Nueva Jersey, EUA) y DNAasa, a una concentración de 1 mg/ml y 1.5 mg/ml, respectivamente, disueltas en HBSS. 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 a 800 rpm. 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. De la suspensión se sembraron alícuotas de 50 µl sobre 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. tratado previamente con Poli-L-Lysina (Incubación del vidrio en una solución 0.1 mg/ml de PLL, 8h a 4 °C).

Después de observar que la mayoría de las células se han adherido al fondo del cubreobjetos, se agregó 1 ml de DMEM a cada pozo y la placa se colocó en una incubadora húmeda en una atmósfera compuesta de 95% aire y 5% CO₂. Los cultivos así obtenidos fueron empleados para registro desde 24 hasta 96 horas después de su siembra en la mayoría de los casos.

En el caso en que se aplicó AMPc, las células se mantuvieron en incubación con las características antes mencionadas con la variante de que al mililitro de DMEM que se agregó a cada pozo, se le aplicó un análogo permeable a la membrana de AMPc: clorofeniltio-AMPc a concentración de 200 μ M y se mantuvieron así hasta las 96 horas de incubación (Novara et al., 2004; Giaccipoli et al., 2004, 2006).

6.2 Registro extracelular de corrientes del potencial de acción en células cromafines individuales

En 1982, Fenwick E. y colaboradores observaron que al emplear la técnica de “patch clamp” en configuración de célula adosada y modo fijación de voltaje “loose cell attached” en microáreas de membrana, las espigas de corriente que resultaban del disparo espontáneo de potenciales de acción, se podían registrar a través del parche de membrana intacto. Si el parche se mantiene a un potencial fijo, los potenciales de acción que se generan en la célula producen corrientes de membrana bifásicas a través del parche de membrana.

Tomando en cuenta al interior de la pipeta como punto de referencia, el primer componente de estas ondas es una espiga de corriente negativa, ya que fluye del interior de la célula hacia el interior de la pipeta. El segundo componente es una espiga más pequeña y redondeada que fluye en la dirección opuesta (Fig 4). Esta configuración ha sido utilizada por otros investigadores para el estudio de actividad eléctrica espontánea en otros tipos celulares (Wang y Huang 2006, Kitamura 2005).

En el presente estudio utilizamos la técnica de “patch-clamp” en la modalidad de célula adosada “loose cell attached”, que es una técnica no invasiva para el registro de la actividad eléctrica extracelular, debido a que necesitábamos obtener mediciones ciertas de la frecuencia de disparo de los potenciales de acción más que obtener el valor exacto del potencial de membrana durante el registro.

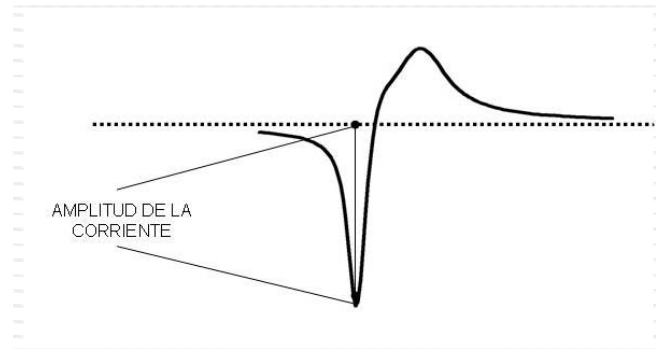


Fig 4. Ejemplo de registro extracelular de corrientes del potencial de acción. Se indica la manera en la cual se midió la amplitud de la corriente.

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 Lynch, 1989):

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

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 por qué 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 e Isope, 2000).

Los cubreobjetos con el cultivo de células cromafines fueron colocados en el fondo de una cámara de registro desmontable que se adapta a la platina de un microscopio invertido Diaphot 2 (Nikon Corp., Tokio, Japón). Las células a registrar fueron identificadas por inspección visual utilizando magnificación de 100x NPL Fluotar (Leica Microsystems AG; Wetzlar, Alemania).

Las pipetas de registro fueron elaboradas mediante un estirador de vidrio o “puller” modelo P-97 (Sutter Instruments Co., EUA) usando capilares de borosilicato de diámetro externo de 1.2 mm. y diámetro interno de 0.69 mm. (Warner Instrument Corp., Hamdem, Connecticut, EUA).

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 extracelular con resistencia de entrada entre 3.0 y 4.0 M Ω . El potencial de la pipeta se fija a 0 mV mediante el uso de un amplificador en modo de fijación de voltaje Axoclamp 1-D (Axon Instruments, Union City, CA, EUA); la pipeta se va aproximando lentamente a la célula, con la ayuda de un micromanipulador piezoeléctrico Burleigh PZ-301 (Burleigh Instruments Inc., Fishers NJ, EUA), a medida que la pipeta se aproxima a la superficie de la célula la resistencia entre la pipeta y la célula aumenta. En este momento, se aplica una ligera presión negativa (succión) con la boca hacia la pipeta sólo hasta el punto en que la resistencia se mantuvo estable al rededor de los 30 – 40 M Ω .

Debido a que no se necesita establecer un sello de alta resistencia “loose cell attached”, esto nos facilita poder utilizar la misma pipeta para el registro sucesivo de varias células de forma rutinaria siempre y cuando la resistencia de la pipeta se mantenga dentro de los valores antes mencionados. La resistencia del sello fue monitoreada constantemente durante el registro y los registros en los que la resistencia varió súbitamente no se tomaron en cuenta para el 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. La adquisición de los datos fue controlada desde la computadora mediante el programa Clampex ver. 8.01 (Axon Instruments) en modo de adquisición continua (gap-free).

Después de lograr un sello estable, se obtuvo un registro de corriente continuo de dos minutos para determinar la frecuencia de disparo en condiciones basales (control). Para la aplicación de drogas, un segundo registro de dos minutos fue obtenido durante la aplicación de cada droga. Por último se realizó un lavado de las drogas y después de dos minutos de éste, se obtuvo un registro de dos minutos para determinar si los efectos de las drogas desaparecían.

Las drogas fueron diluidas, a partir de soluciones concentradas preparadas previamente, en solución externa (la concentración final del vehículo para estas drogas

en la solución no excedió 1:1000), y se llenó con ella una pipeta de vidrio con diámetro de la punta de entre 5 y 10 μm . Esta pipeta se colocó dentro del mismo plano focal que la célula en registro con la punta a aproximadamente 50 μm de distancia de la célula por medio de un micromanipulador eléctrico MS314 (Fine Science Tools, Inc., Foster City CA, EUA). La eyección de la solución de esta pipeta sobre la célula en registro fue regulada mediante un controlador de pulsos de presión (aproximadamente 10 psi) Picospritzer II (General Valve Corp. NJ, EUA).

6.3 Preparación de soluciones

Para el registro extracelular de corrientes de acción se utilizó la siguiente solución salina, la cual fue la misma con que la pipeta de registro fue llenada, así como donde las drogas utilizadas se diluyeron. El pH fue ajustado a 7.4 con NaOH.

COMPUESTO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN (mM)
Cloruro de Sodio	NaCl	145.0
Cloruro de Potasio	KCl	3.0
Cloruro de Calcio	CaCl ₂	2.0
Cloruro de Magnesio	MgCl ₂	2.0
Bicarbonato de Sodio	NaHCO ₃	1.0
Fosfato monobásico de Sodio	NaH ₂ PO ₄	0.5
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	5.0
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	5.0

Las drogas utilizadas fueron diluidas en solución extracelular a partir de una solución concentrada antes de cada experimento con las siguientes concentraciones:

10 μM de mibefradil

1 y 10 μM de tetrodotoxina

10 y 50 μM de fenitoína

10 y 100 μM de riluzole

20 y 40 μM de vinpocetina

Todas las soluciones empleadas fueron preparadas usando agua desionizada de 18 megaohmios (NanoPURE, Barnstead International, Dubuque, Iowa, EUA).

6.4 Análisis de datos

El análisis de los registros de corrientes de acción se llevó a cabo con el programa Clampfit 9.0 (Axon Instruments) y consistió en la extracción de los eventos ocurridos para determinar la frecuencia de disparo así como la amplitud de las corrientes de la siguiente manera.

Primero se obtiene una forma ejemplar “templado” de los eventos de un registro, que resulta de promediar una serie de trazos recuperados del registro. Es decir, se toman de 10 a 20 de eventos del registro al azar y se alinean respecto a diferentes puntos: inicio, amplitud máxima y fin del evento. A partir de éste templado, se buscan todos los eventos similares que suceden a lo largo del registro. Una vez obtenida esta forma ejemplar, por medio de la utilería del programa “event search”, se le indica que localice todos los eventos con características similares al templado en todo el registro.

Después de esta detección de eventos, se inspecciona visualmente si los eventos detectados corresponden a corrientes de acción o a señal ruido que el programa pudo haber confundido. En el último caso, se descartan las señales que no sean corrientes del potencial de acción para analizar únicamente los eventos verdaderos. Los eventos son medidos a partir de la línea basal que se determina con base en el templado, 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 con 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. Las secciones del registro donde se localizaron eventos fueron almacenados

por separado en un archivo. El trazo obtenido al promediar todos los eventos de un registro (trazo promedio del registro) se ilustra al lado de cada uno de los registros ejemplificados en la sección de resultados.

Para cada evento identificado, se cuantificaron los siguientes parámetros: número de eventos para determinar la frecuencia de disparo y la amplitud máxima promedio (Fig 4). Para el caso en que se probaron los efectos de diferentes drogas se analizó de la misma manera, y para observar el efecto de la droga cada registro se comparo con su registro control. 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 pasa bajos Gaussiano con frecuencia de corte 1000 Hz y un filtro pasa-altos Bessel de 8 polos con frecuencia de corte de 1 Hz.

El análisis estadístico así como la composición de las figuras se realizaron mediante los programas Origin 6.0 (OriginLab Corp., North Hampton, Massachusetts, EUA) Excel, Power Point y el programa estadístico Statview 4.57 (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA.). Los datos fueron comparados utilizando la prueba de análisis de la varianza de una vía (“One-way ANOVA”) con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Los datos normalizados en el caso del análisis de la amplitud de la espiga, se obtuvieron a partir del registro control que equivale al 100 % y el porcentaje de los datos del registro con la aplicación de la droga depende exclusivamente de su registro control.

7. RESULTADOS

7.1 Participación de canales de Ca^{2+} de tipo T en corrientes del potencial de acción espontáneas de células cromafines de rata en cultivo.

Para observar la participación de los canales de Ca^{2+} tipo T en la generación de potenciales de acción espontáneos en células cromafines de rata, se eliminó el componente de sodio de las corrientes del potencial de acción, para este fin, se aplicó 1 μM de TTX.

Los resultados muestran una disminución significativa de 70.5 % en la amplitud de la espiga de las corrientes del potencial de acción como se muestra en la figura 5B y 6B. No obstante, puede observarse que la actividad eléctrica se mantuvo durante el registro en forma de pequeñas espigas, como las que se ilustran en la figura 5B.

En base a los trabajos de Huguenard y Pérez-Reyes, examinamos si esas pequeñas espigas corresponden a espigas generadas por canales de Ca^{2+} tipo T. Para esto, a las células que se encontraban en presencia de 1 μM de TTX adicionalmente se les aplicó 10 μM de mibefradil, un bloqueador específico de canales de Ca^{2+} tipo T, con el objeto de inhibir las espigas en caso de que éstas fuesen generadas por la activación de canales de Ca^{2+} tipo T.

Si bien, luego de la aplicación de la droga se observan efectos inmediatos en la frecuencia de disparo, no se aprecian cambios significativos en la amplitud de la espiga (figura 5C y 6A).

Como se observa en la figura 6A, la aplicación de 1 μM de TTX disminuye ligeramente la frecuencia de disparo de las espigas de 1.35 ± 0.13 a 1.01 ± 0.16 Hz ($n=13$). Sin embargo esta pequeña disminución no fue estadísticamente significativa. Por otra parte, cuando a las células que ya se encontraban en presencia de TTX, se les aplicó 10 μM de mibefradil, se observó una disminución significativa de la frecuencia de disparo, la cual decae hasta 0.33 ± 0.10 Hz ($n=13$; véanse las figuras 5C y 6A).

Sorprendentemente, durante la aplicación conjunta de los bloqueadores de canales de Na^+ y de canales de Ca^{2+} tipo T, aún siguen observándose pequeñas espigas (figura 5C). Los efectos de los bloqueadores aplicados fueron parcialmente reversibles después del lavado con solución externa sin drogas (figuras 5D, 6A y 6B).

Estos resultados sugieren que los canales de Ca^{2+} tipo T están implicados en el origen de la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines de rata, sin

embargo, dicha actividad no se debe enteramente a la participación de estos canales. Otros canales, específicamente los de sodio, deben estar implicados.

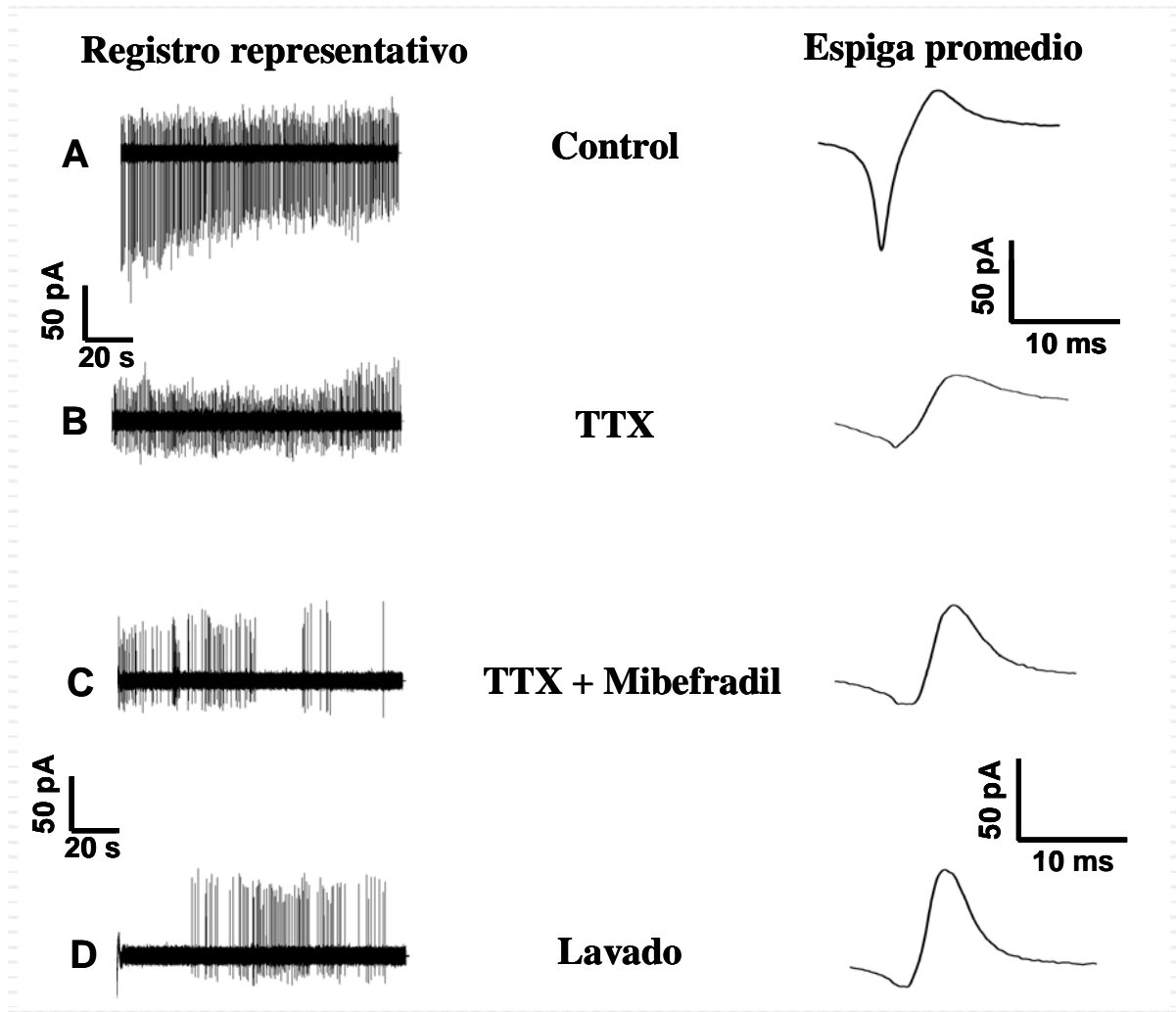


Fig. 5. Efecto de TTX y mibefradil sobre las corrientes del potencial de acción espontáneas. A la izquierda se observan los trazos representativos obtenidos de una misma célula en las siguientes condiciones: A) control, B) durante la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de TTX, C) durante la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de TTX y $10 \mu\text{M}$ de mibefradil y, D) 2 minutos después de lavado. A la derecha se observan las espigas promedio obtenidas de cada registro.

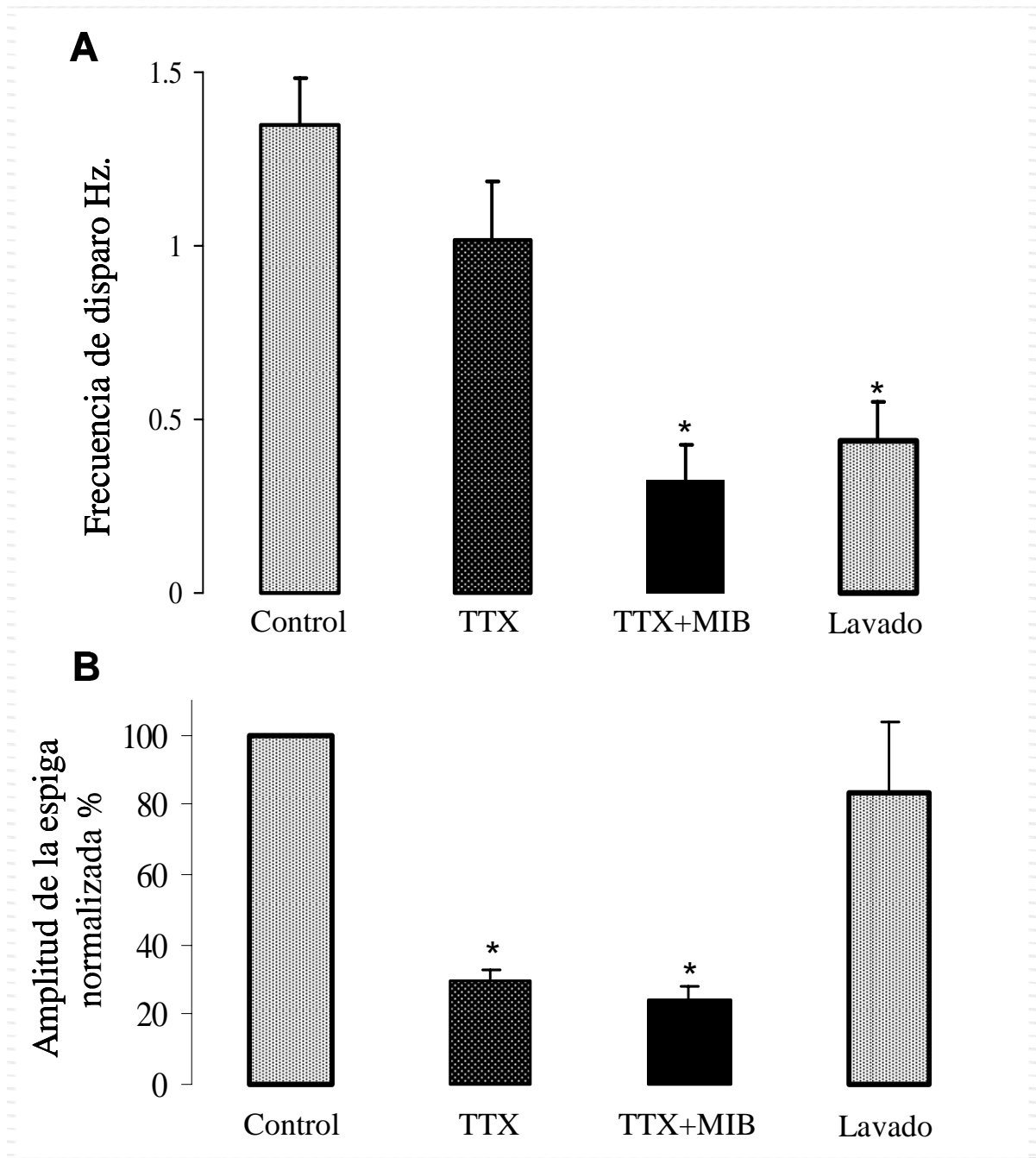


Fig. 6. Resumen del efecto de TTX y mibefradil sobre: A) la frecuencia de disparo y B) la disminución de la amplitud de la espiga normalizada de corrientes del potencial de acción espontáneas registradas extracelularmente en células cromafines de rata en cultivo (* $p < 0.05$ respecto al control).

7.2 Efecto de la incubación con AMPc sobre la actividad eléctrica espontánea de células cromafines de rata en cultivo.

Como se explicó anteriormente, aunque los canales de Ca^{2+} tipo T no son responsables de generar la actividad eléctrica, su inhibición con bloqueadores específicos disminuye la frecuencia de disparo de los potenciales de acción espontáneos.

Para estudiar en mayor detalle la participación de los canales de Ca^{2+} tipo T, se trataron células cromafines en presencia de un análogo de AMPc permeable a través de la membrana con el propósito de sobre expresar canales de Ca^{2+} tipo T, este efecto del AMPc se observa a partir del tercer día de incubación (Novara 2004 y Giaccipoli 2006).

Los resultados que obtuvimos luego del tratamiento con AMPc se muestran en las figuras 7 y 8. El AMPc afecta de manera significativa la actividad eléctrica espontánea, tanto en la amplitud de la espiga como en la frecuencia de disparo. Dichos efectos se hacen más notorios conforme transcurre el tiempo de tratamiento.

A partir de las 72 horas de cultivo se observa que la frecuencia de disparo disminuye de 1.97 ± 0.21 Hz (n=13) en las células control a 1.24 ± 0.28 Hz (n=19) en las células tratadas con AMPc (figura 7).

El mayor efecto se observó a las 96 horas de cultivo. La diferencia entre las células que no recibieron tratamiento con AMPc y las que si lo recibieron aumenta mostrando frecuencias de disparo de 1.70 ± 0.23 (n=7) y 0.71 ± 0.32 (n=4) Hz, respectivamente (figura 7).

Otro efecto de la incubación con AMPc tiene que ver con la amplitud de la espiga. Esta se incrementa conforme avanza el tiempo de tratamiento: a las 72 horas ya existen diferencias significativas en la amplitud de la espiga entre las células tratadas con AMPc y las células control (figura 8), y a las 96 horas de tratamiento la amplitud de la espiga casi triplica a la de las células mantenidas en condiciones control. (figura 8).

Estos resultados demuestran que contrariamente a lo que esperábamos, el tratamiento con AMPc no incrementa la frecuencia en la generación de potenciales de acción espontáneos, sino que por el contrario, la disminuye.

Por otra parte, encontramos que el tratamiento con AMPc incrementa hasta tres veces la amplitud de las espigas registradas extracelularmente con respecto a la de las células no tratadas.

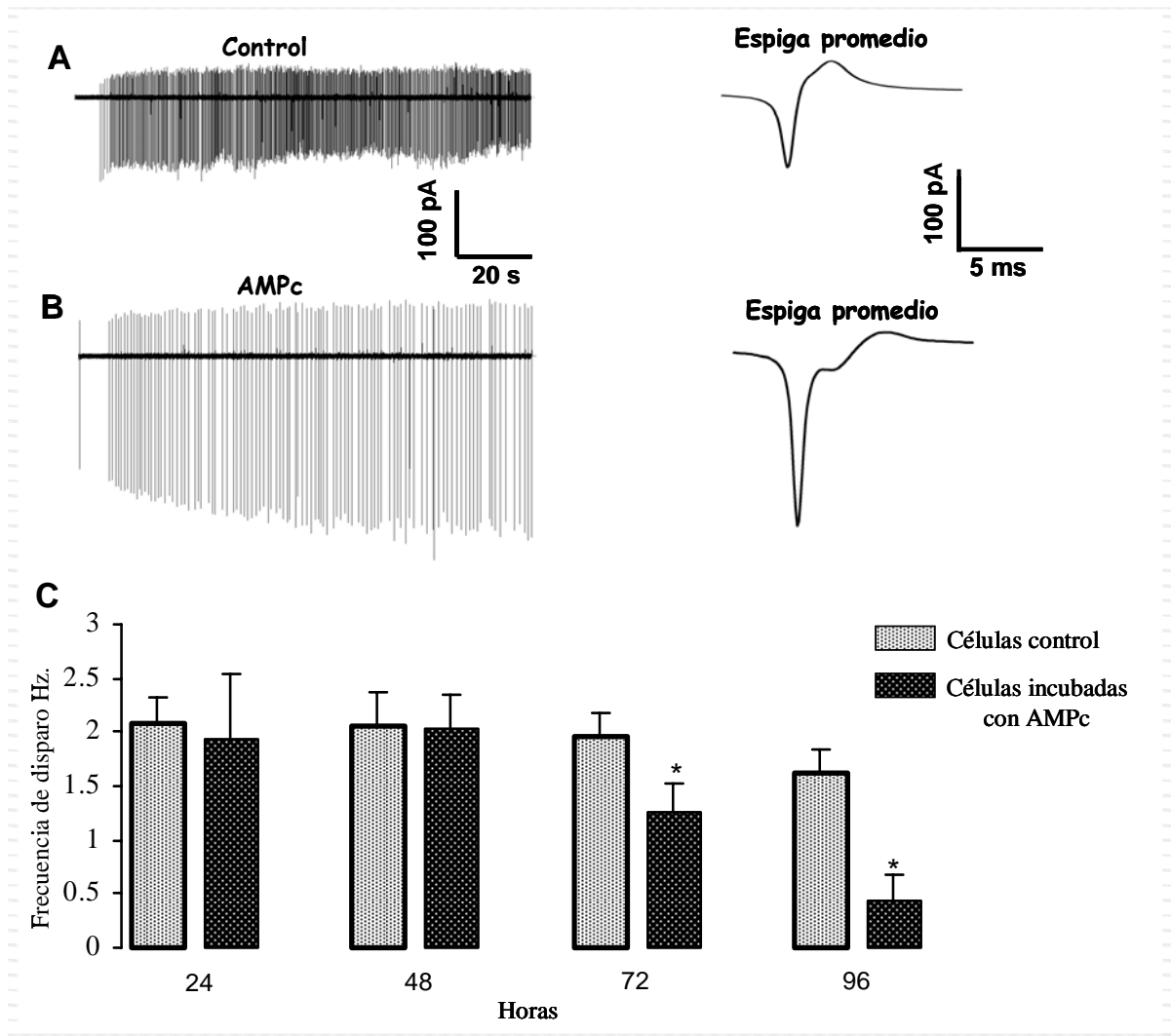


Fig. 7. Efecto del tratamiento con AMPc sobre la actividad eléctrica de las células cromafines. A) Registro representativo de corrientes del potencial de acción en una célula sin tratamiento después de las 96 horas de cultivo. La espiga promedio respectiva aparece a la derecha. B) Registro representativo de las corrientes del potencial de acción de una célula cromafin después de 96 horas de cultivo con AMPc y su respectiva espiga promedio a la derecha. C) Resumen del efecto, sobre la frecuencia de disparo, de la incubación con AMPc en función del tiempo (* $p < 0.05$ respecto al correspondiente control).

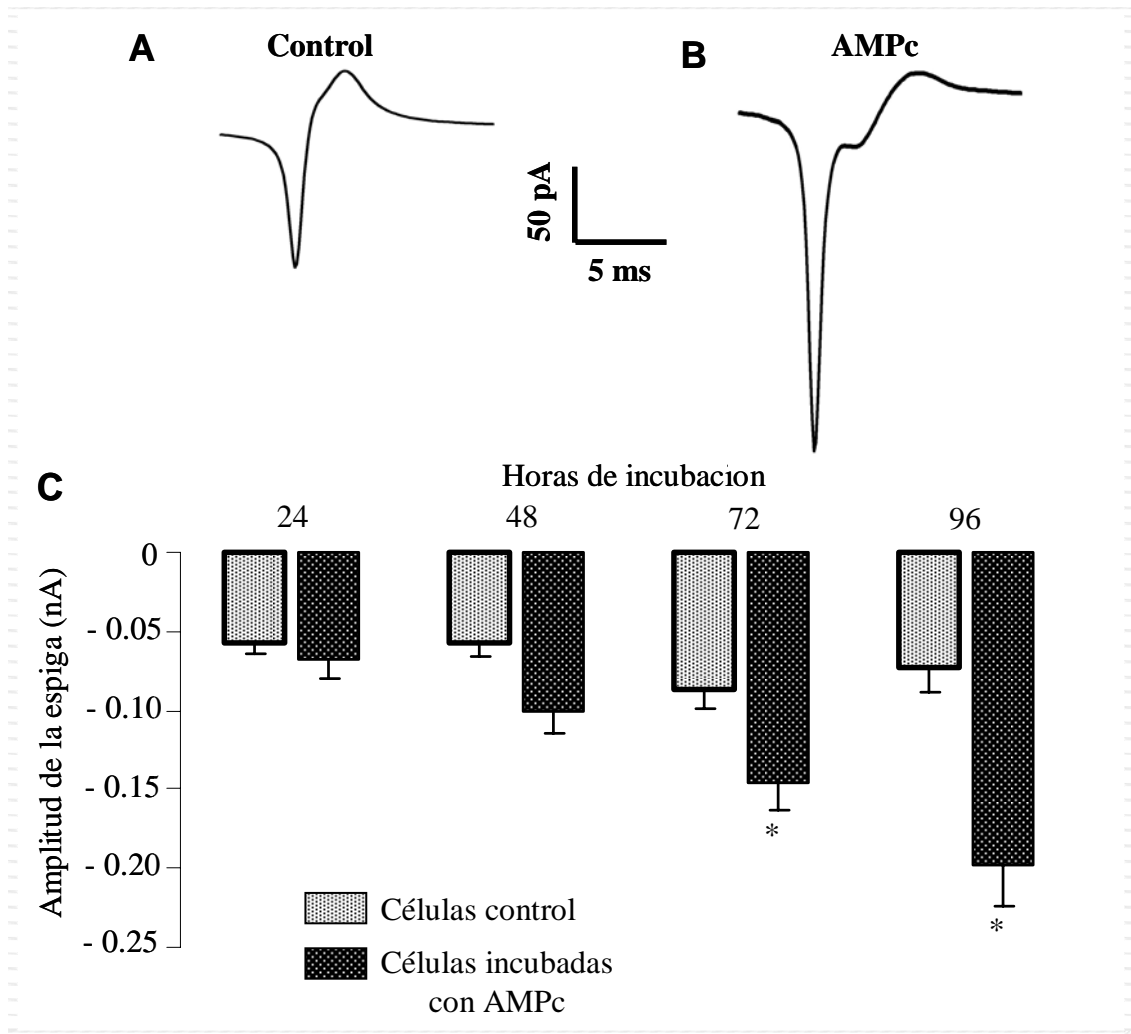


Fig. 8. Efecto de la incubación con AMPc sobre la amplitud de la espiga. A) Espiga promedio a las 96 horas de cultivo en una célula control. B) Espiga promedio a las 96 horas de cultivo en una célula en presencia de AMPc. C) Resumen del efecto del tratamiento con AMPc sobre la amplitud de la espiga en células cromafines, en función del tiempo de cultivo (* $p < 0.05$ con respecto del correspondiente control).

7.3 Efecto de TTX sobre la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata en cultivo

Como se observa en los resultados de la figura 5, cuando aplicamos TTX que es bloqueador específico de los canales de Na^+ disminuye la amplitud de la corriente pero no suprime totalmente las corrientes del potencial de acción espontáneas en las células cromafines.

Para estudiar con mayor detalle este efecto, utilizamos dos concentraciones diferentes del bloqueador, 1 y 10 μM . Los efectos comparativos se muestran en la figura 9, donde puede observarse que a 1 μM de TTX, se afecta mayoritariamente la amplitud de la espiga, aunque también se afecta la frecuencia de disparo.

En la figura 9A se muestran trazos representativos en una misma célula de un registro control, durante la aplicación de TTX y 2 minutos después del lavado, con su respectiva espiga promedio en la parte inferior. Es notorio que durante la aplicación de TTX disminuye la amplitud de la espiga, aunque no se inhibe la actividad eléctrica espontánea, la cual permanece en forma de espigas muy pequeñas.

En la figura 9B se comparan los efectos dependientes de la dosis de TTX sobre la frecuencia de disparo y la amplitud de la espiga. Cabe resaltar que cuando aplicamos la mayor concentración de TTX (10 μM), aún persiste la actividad eléctrica espontánea (figura 9).

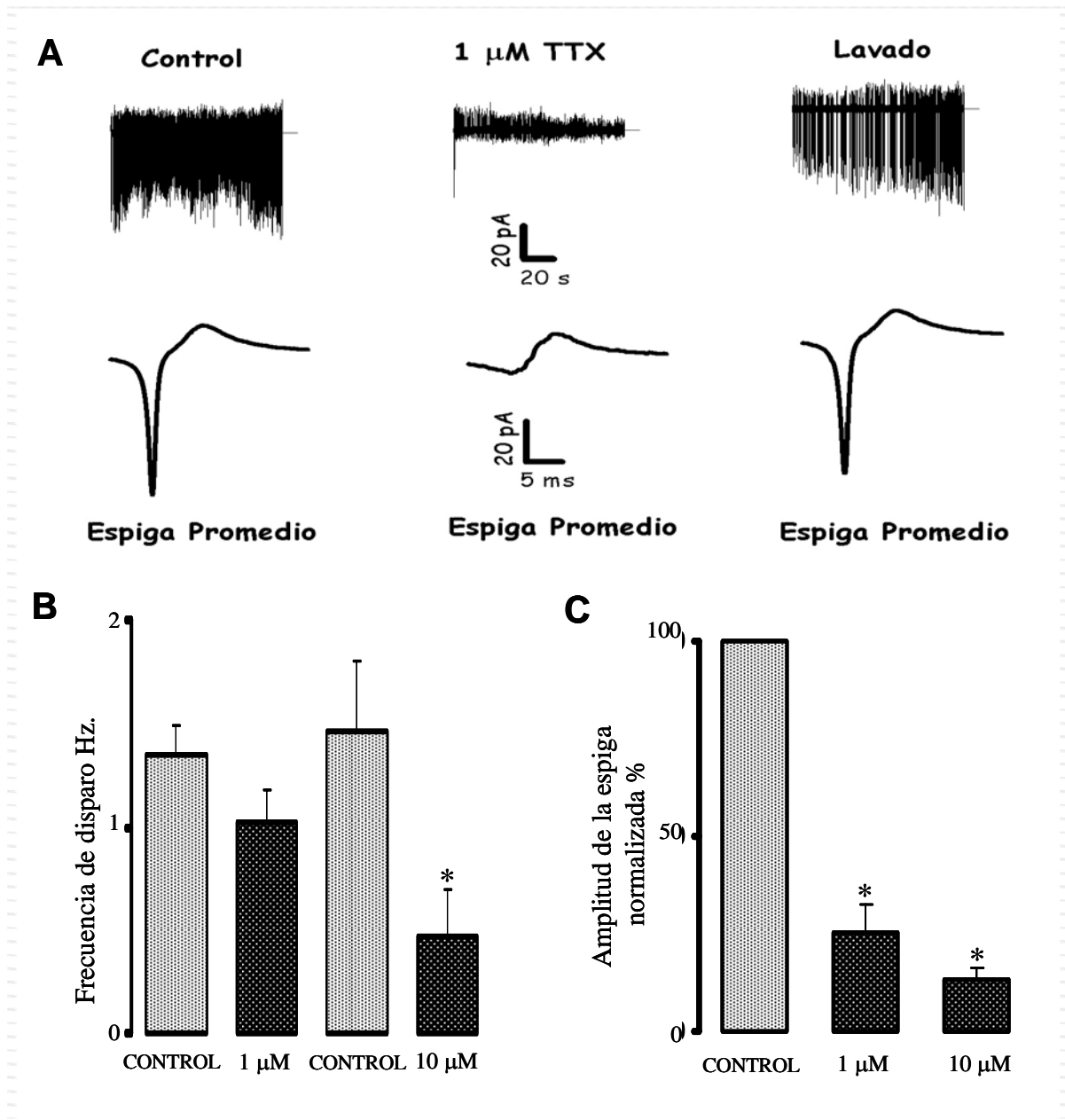


Figura 9. Efecto de TTX sobre las corrientes de potenciales de acción espontáneos. A) Trazo representativo de corrientes de acción en condiciones: control, durante la aplicación de 1 μM de TTX y 2 minutos después de lavado, con su respectiva espiga promedio en la parte inferior. B) Resumen de los efectos de TTX sobre la frecuencia de disparo de las corrientes de acción. C) Resumen del efecto de TTX sobre la amplitud de la espiga normalizada de corrientes de potenciales de acción. (* $p < 0.05$ respecto del control).

7.4 Efecto del bloqueo de canales de Na⁺ persistentes sobre la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata

Como lo mostramos anteriormente, no solo los canales de Ca²⁺ tipo T están implicados en la generación de la actividad eléctrica espontánea en las células cromafines de rata, también los canales de Na⁺ están implicados. Cuando aplicamos TTX aún a concentraciones altas, solo se afecta la amplitud de la espiga de potenciales de acción y en menor manera, la frecuencia de disparo.

En los trabajos de Darbon (2004) se muestra que la llamada *corriente de Na⁺ persistente* es capaz de originar actividad eléctrica espontánea en algunas células excitables (Jinno, 2005; Beurrier, 2000). Actualmente, no hay reportes de la presencia de canales de Na⁺ persistentes en las células cromafines. Sin embargo, decidimos evaluar el efecto de bloqueadores de los canales de Na⁺ persistentes sobre la actividad eléctrica espontánea de estas células.

Existen diferentes fármacos que han demostrado bloquear específicamente dichos canales. Estos fármacos son comercializados y utilizados en la clínica como anticonvulsivos y neuroprotectores (Bonockz P, 2000; Yokoo, 1998; Beltrán P, 2003; Stefani, 1997; Darbon, 2004), debido a que al bloquear canales de Na⁺ dependientes de voltaje, reducen la excitabilidad y evitan la acumulación de Na⁺ y Ca²⁺ en el interior celular (Jordan, 2003; Zhou, 2003). Estos fármacos son la fenitoína, el riluzole y la vinpocetina.

El primer fármaco que utilizamos fue la fenitoína, a dos diferentes concentraciones, 10 y 50 μM. Los efectos que tuvo la fenitoína sobre la actividad eléctrica espontánea fue muy similar con ambas concentraciones: la frecuencia de disparo disminuyó significativamente respecto a sus controles. En los registros extracelulares (figura 10A) se aprecia como disminuye la frecuencia de disparo así como la amplitud de la espiga de las corrientes del potencial de acción.

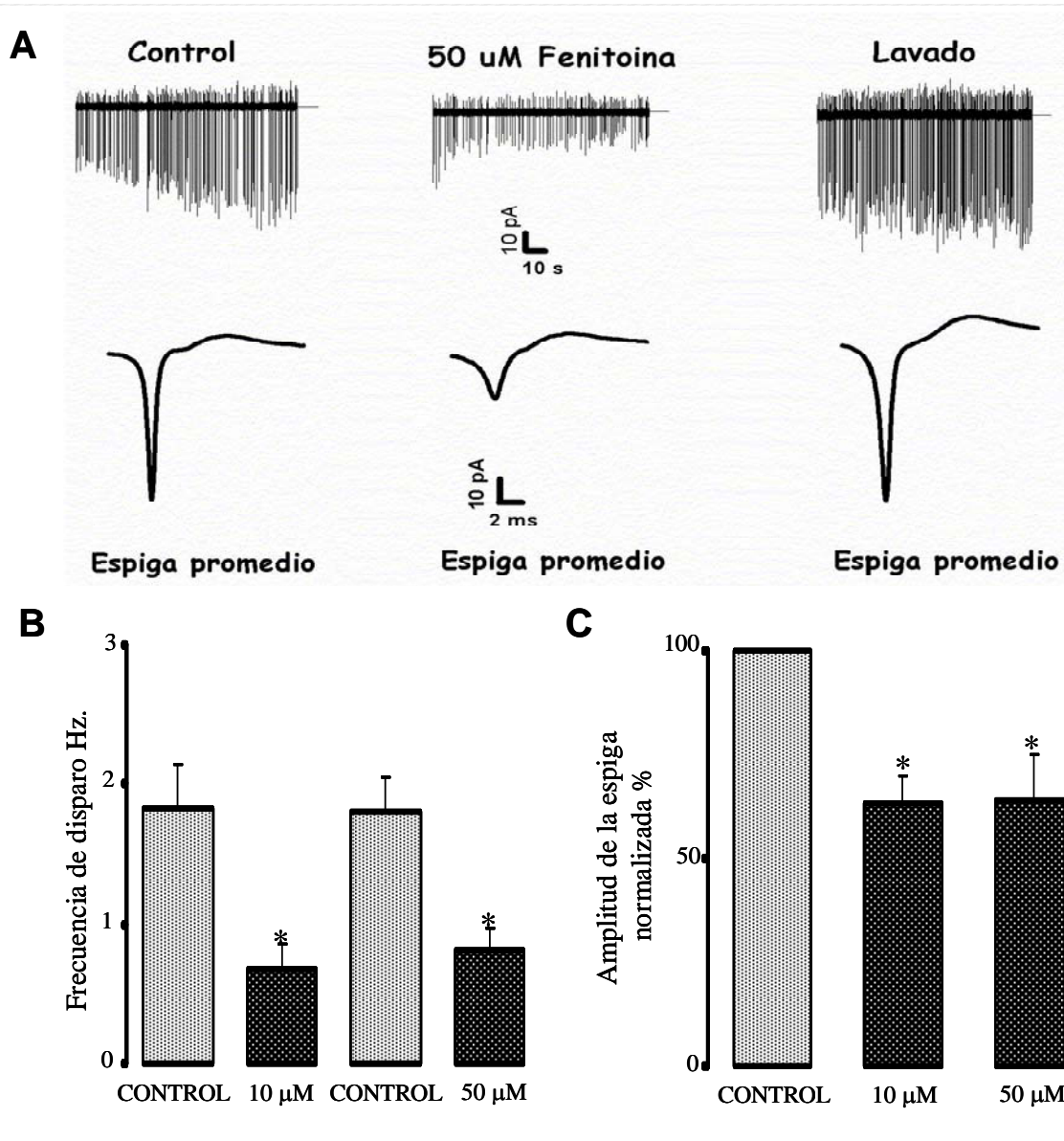


Fig. 10. Efecto de fenitoína sobre corrientes de potenciales de acción espontáneos. A) Trazo representativo de corrientes de potenciales de acción espontáneos en condiciones: control, durante la aplicación de 50 μ M de fenitoína y dos minutos después del lavado. B) Resumen del efecto de 10 y 50 μ M de fenitoína sobre la frecuencia de disparo de corrientes de potenciales de acción. C) Resumen del efecto de 10 y 50 μ M de fenitoína sobre la amplitud de la espiga normalizada de corrientes de acción. (* $p < 0.05$ respecto del control).

La frecuencia de disparo de las células cromafines disminuyó de 1.83 ± 0.32 a 0.67 ± 0.18 Hz ($n=12$) y de 1.81 ± 0.24 a 0.80 ± 0.158 Hz ($n=20$) en 10 y 50 μ M de fenitoína, respectivamente (Figura 10B). Por otra parte, la amplitud de la espiga de las corrientes de potenciales de acción disminuyó en 36.5 y 35.9 % con respecto a sus controles a 10 y 50 μ M de fenitoína respectivamente (Figura 10C).

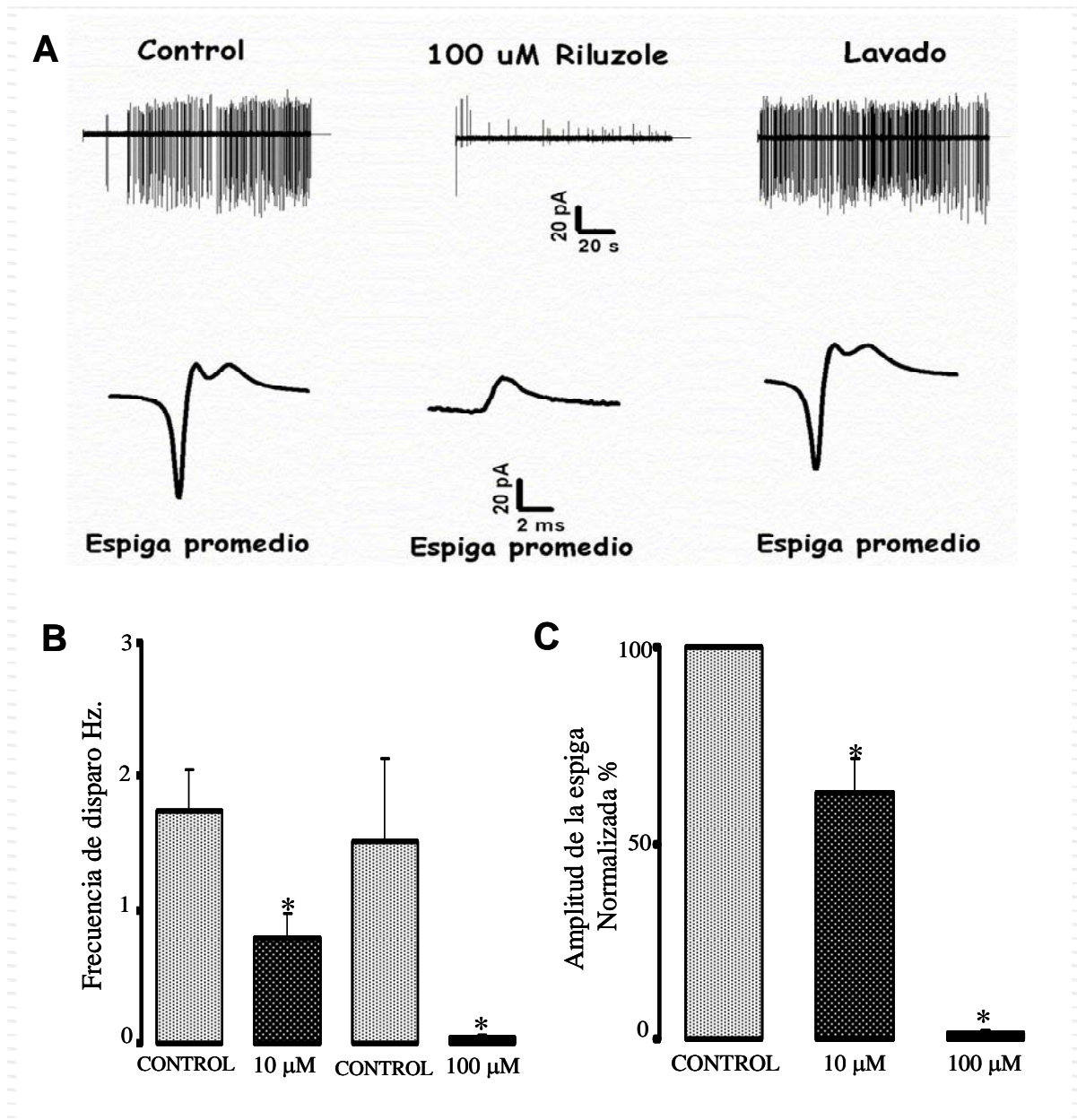


Fig. 11. Efecto de riluzole sobre la actividad eléctrica espontánea. A) Trazo representativo de corrientes de potenciales de acción espontáneos en condiciones: control, durante la aplicación de 100 μ M de riluzole y dos minutos después de lavado. B) Resumen del efecto de 10 y 100 μ M de riluzole sobre la frecuencia de disparo de corrientes de potenciales de acción. C) Resumen del efecto de 10 y 100 μ M de riluzole sobre la amplitud normalizada de la espiga de corrientes de potenciales de acción. (* $p < 0.05$ respecto al control).

El segundo fármaco utilizado que ejerce sus efectos sobre los canales de Na^+ persistentes, fue el riluzole. Dicho fármaco se aplicó a dos concentraciones diferentes 10 y 100 μ M. La aplicación de 100 μ M de riluzole presentó el mayor efecto, al inhibir casi por completo la actividad eléctrica espontánea (Figuras 11A, 11B y 11C). La frecuencia de disparo se redujo de 1.73 ± 0.3 a 0.78 ± 0.18 Hz ($n=13$) con 10 μ M de riluzole y de 1.51 ± 0.61 a 0.03 ± 0.03 Hz ($n=5$) con 100 μ M de riluzole (Figura 11B).

Con respecto a la amplitud de la espiga, se produjo una disminución significativa de 37.6 y 98.8 % con 10 y 100 μM de riluzole respectivamente (Figura 11C).

Por último, evaluamos el efecto de vinpocetina, un fármaco que también se ha demostrado que bloquea canales de Na^+ persistentes, sobre la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines.

Al igual que fenitoína y riluzole, la vinpocetina disminuyó significativamente la frecuencia de disparo y la amplitud de la espiga de las corrientes de potenciales de acción espontáneos a las diferentes concentraciones empleadas (20 y 40 μM).

En el registro se observó que la aplicación de 40 μM de vinpocetina reduce la frecuencia de disparo y la amplitud de la espiga de las corrientes de potenciales de acción (Figura 12A). En cuanto a la frecuencia de disparo se refiere, ésta disminuyó de 1.27 ± 0.18 a 0.27 ± 0.08 Hz ($n=20$) y de 1.45 ± 0.19 a 0.41 ± 0.09 Hz ($n=26$) con 20 y 40 μM de vinpocetina respectivamente (Fig. 12B).

Adicionalmente, la amplitud de la espiga de las corrientes de potenciales de acción disminuyó 62.9 y 65.8 % con concentraciones de 20 y 40 μM de vinpocetina, respectivamente (Figura 12C).

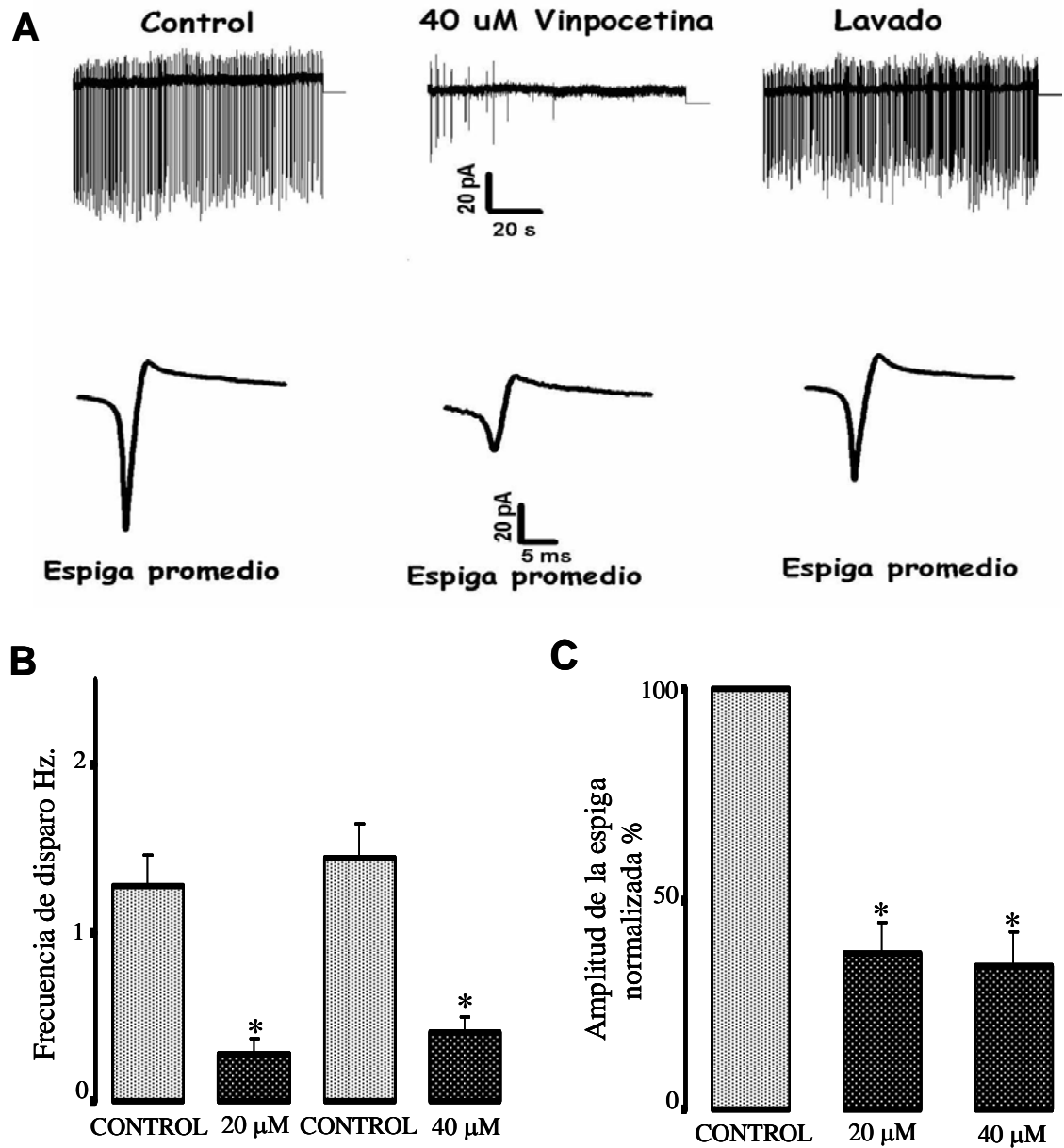


Fig. 12. Efecto de vinpocetina sobre las corrientes de potenciales de acción espontáneos. A) Trazo representativo de corrientes de potenciales de acción espontáneos registradas en condiciones: control, durante la aplicación de 40 μ M de vinpocetina y dos minutos después del lavado. B) Resumen de los efectos de vinpocetina sobre la frecuencia de disparo de corrientes de potenciales de acción. C) Resumen de los efectos de vinpocetina sobre la amplitud de la espiga normalizada de las corrientes de potenciales de acción. (* $p < 0.05$ respecto del control).

8. DISCUSIÓN

8.1 Los canales de Ca^{2+} tipo T participan en la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines de rata.

Hollins e Ikeda en 1996, mostraron que la corriente de Ca^{2+} de bajo umbral, de tipo T, únicamente se presenta en una pequeña fracción de las células cromafines de rata adulta (20% aproximadamente). Por otro lado, Bournaud (2001) y colaboradores, en estudios sobre células cromafines fetales de rata, reportaron que alrededor del 50% de ellas muestran corrientes de Ca^{2+} tipo T.

En estudios previos del laboratorio del Dr. Arturo Hernández Cruz, se demostró que los canales de Ca^{2+} de tipo T son importantes para generar y regular la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines fetales de rata. Debido a que existe una diferencia significativa en la frecuencia de disparo y disminución de la espiga de corrientes de potenciales de acción espontáneos cuando se aplicó directamente 10 μM de mibefradil a células que presentaban dicha actividad (Escobedo 2006).

Nuestros resultados muestran que esta situación se mantiene durante los primeros días del desarrollo postnatal, y que los canales de Ca^{2+} tipo T continúan contribuyendo en la frecuencia de disparo de actividad eléctrica espontánea en los animales inmaduros. Por tal motivo proponemos que mientras dichos animales maduran y la proporción de canales de Ca^{2+} disminuye, como lo muestran estudios del grupo de Hollins e Ikeda, al menos, la frecuencia de disparo de potenciales de acción también disminuye o es menor en comparación a la de animales inmaduros (Brandt et al., 1976)

Los resultados de este trabajo muestran claramente que los canales de Ca^{2+} tipo T juegan un papel importante en la regulación y generación de la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines de ratas recién nacidas en cultivo. Algo similar se ha observado en células GT1, donde se ha demostrado que la actividad eléctrica espontánea se lleva a cabo por dos tipos de corriente, la corriente de Ca^{2+} tipo T y la corriente de Na^+ (Van Goor, 2006).

Nuestros resultados demostraron la existencia de espigas de bajo umbral como lo demostró Huguenard (1992 y 1996) en neuronas del tálamo. Esto es importante debido a que la actividad eléctrica espontánea se mantuvo en forma de espigas pequeñas, las cuales se observan después de eliminar el componente rápido de Na^+ de los potenciales de acción espontáneos. Huguenard en 1992 mencionó que la participación de canales de

Ca²⁺ tipo T es indispensable para generar actividad eléctrica espontánea en neuronas del tálamo.

En base a esto, podemos decir que los canales de Ca²⁺ tipo T están implicados en gran medida en generar y mantener los potenciales de acción espontáneos durante esta etapa del desarrollo. Aunque no se debe la generación de la actividad eléctrica espontánea únicamente a la activación de dichos canales. Esto nos sugiere que otro tipo de conductancias subumbrales participan activamente en la despolarización inicial que lleva al disparo de potenciales de acción en las células cromafines.

Hay que tomar en cuenta que es necesario llevar a cabo más estudios electrofisiológicos para definir concretamente la participación de los canales de Ca²⁺ tipo T en la actividad eléctrica espontánea en este tipo celular y durante esta etapa del desarrollo específicamente. Así mismo, es necesario implementar experimentos en donde se pueda evaluar el papel que desempeñan los canales de Ca²⁺ tipo T en la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata en otras etapas del desarrollo, como juvenil y adulto. Una forma de abordar el objetivo es llevando a cabo la metodología de “parche-perforado” de la técnica de “patch-clamp”, mediante la cual es posible realizar un estudio que nos aporte en mayor detalle las propiedades biofísicas de las células cromafines.

8.2 Disminución de la actividad eléctrica espontánea en células cromafines tratadas con AMPc.

Por medio de los resultados publicados por el grupo de Emilio Carbone (Novara y Giaccipoli en 2004 y 2006), donde sobre-expresan canales de Ca²⁺ tipo T por medio de incubación de las células cromafines con AMPc, además de demostrar que la respuesta secretora aumenta a ligeras despolarizaciones respecto a las células no tratadas; decidimos incubar a las células cromafines de ratas recién nacidas de la misma forma para sobre-expresar canales de Ca²⁺ tipo T.

Sin embargo nuestros resultados no confirmaron nuestra hipótesis. Nosotros esperábamos que al obtener un incremento en el número de canales de Ca²⁺ tipo T, iba a aumentar la frecuencia de disparo de potenciales de acción espontáneos; debido a que la disponibilidad de un mayor número de canales de Ca²⁺ tipo T podía disminuir el umbral de excitación durante el disparo del potencial de acción (Novara, 2004), lo cual nos hizo pensar que podría darse un incremento en la frecuencia de potenciales de acción espontáneos en dichas células.

Nuestros resultados se pueden explicar por los múltiples efectos que produce el AMPc en diferentes células. Además de ser uno de los mejores segundos mensajeros conocidos y desencadenar cascadas de activación de genes (Kandel, 2000) de entre los cuales puede estar los que codifican para canales de Ca^{2+} tipo T, promueve la iniciación de crecimiento tipo neurita en células PC12 (Gunning, 1981a, 1981b) que es una línea celular tumoral derivada de las células cromafines; además de inducir la neurogenización en células cromafines (Pacheco, 1990). Así mismo, existen reportes de que el tratamiento con AMPc en células de la médula adrenal incrementa considerablemente el reclutamiento de canales de Na^+ dependientes de voltaje, lo cual puede estar enmascarando la sobreexpresión de canales de Ca^{2+} tipo T.

Por lo tanto creemos que es necesario tomar en cuenta otra forma de sobreexpresar a los canales de Ca^{2+} tipo T en este tipo celular, de manera que estemos seguros que sólo está incrementando el número de canales de Ca^{2+} tipo T sin inducir otro tipo de respuestas que puedan influir en nuestros resultados. Con esto no quiero decir que no sea una manera viable de sobreexpresar a los canales de Ca^{2+} tipo T solo quiero dejar en claro que los efectos del AMPc son muy variados y diferentes para cada tipo celular.

Con esto, queda abierta una línea de investigación dirigida únicamente solo a sobreexpresar canales de Ca^{2+} tipo T y evaluar sus efectos en la actividad eléctrica general de éstas células.

Otro resultado que no esperábamos se dio sobre la amplitud de la espiga de corrientes de acción espontáneas. Se observó un incrementó de casi tres veces en la amplitud de la espiga de las células tratadas con AMPc, con respecto a las células no tratadas; lo cual se puede explicar concordantemente con los reportes de que la incubación de células con AMPc, incrementa también el reclutamiento de canales de Na^+ dependientes de voltaje (Yuhi T, 1996); con lo cual, existe una mayor disponibilidad de canales de Na^+ dependientes de voltaje al momento de la despolarización, traduciéndose en un aumento en la amplitud de la espiga de corrientes de potenciales de acción espontáneos.

Desafortunadamente y como anteriormente lo mencionamos, la incubación de células cromafines con AMPc puede estar generando otras respuestas en la fisiología de éstas células antes de sobreexpresar canales de Ca^{2+} tipo T, debido a los múltiples efectos que tiene el AMPc en cascadas de activación de genes.

8.3 El bloqueo de los canales de Na⁺ con TTX no detiene la generación de la actividad eléctrica espontánea

Demostramos que durante la aplicación de TTX (1 y 10 μ M) la amplitud de la espiga de corrientes de acción espontáneas se redujo significativamente, debido al bloqueo de canales de Na⁺ dependientes de voltaje. Los canales son indispensables para la generación de potenciales de acción. Sin embargo, nuestros resultados y los de otros grupos de investigación (Nassar-Gentina, 1998; Brandt, 1976) muestran que la actividad eléctrica espontánea siguió manifestándose en forma de pequeñas espigas; que como anteriormente lo mencionamos, se debe en parte, aunque no totalmente, a la activación de canales de Ca²⁺ tipo T.

Van Goor (2006) demostró que en células GT1 la aplicación de TTX no inhibe la actividad eléctrica espontánea, aunque se modifica el patrón de disparo, lo cual coincide con nuestros resultados obtenidos.

Así mismo, nuestros resultados confirmaron lo observado en otros trabajos, donde se demuestra que los potenciales de acción en células cromafines no se inhiben durante la aplicación del bloqueador clásico de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, TTX (Brandt, 1976; Kidokoro, 1980; Hollins e Ikeda, 1996; Nassar-Gentina, 1998).

La combinación de los resultados obtenidos, tanto de la aplicación de bloqueadores como mibefradil y TTX, con los cuales no se logró eliminar la generación de actividad eléctrica espontánea, y sobre todo cuando utilizamos una concentración alta de TTX, donde si perjudicó significativamente la frecuencia de disparo de potenciales de acción; nos dio pauta para indagar si probablemente los canales de Na⁺ persistentes estén involucrados en la generación de potenciales de acción espontáneos en células cromafines de rata.

8.4 Canales de Na⁺ persistentes participan en la actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata.

Actualmente existen fármacos que son utilizados como anticonvulsivos o neuroprotectores debido a que actúan al bloquear canales de Na⁺ dependientes de voltaje, reducen la excitabilidad y evitan la acumulación intracelular de Na⁺ y Ca²⁺ (Beltrán P y Charles A, 2003; Stefani A, 1997; Jordan, 2003; Zhou, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado ampliamente, que los canales de Na^+ persistentes son bloqueados por estos fármacos anticonvulsivos (Beltran P y Charles A, 2003; Bönöczk P, 2000; Stefani A, 1997; Yokoo, 1998; Urbani, 2000), sin embargo, los mecanismos por los cuales bloquean dichos canales no es del todo claro.

Como lo muestran nuestros resultados, durante la aplicación de cualquiera de los tres fármacos utilizados para el bloqueo de canales de Na^+ persistentes (Fenitoína, Riluzole o Vinpocetina), la frecuencia de disparo de corrientes de acción espontáneas se redujo a cualquier concentración aplicada. Demostrando que la aplicación de estos fármacos repercute en la actividad eléctrica espontánea de las células cromafines de rata al bloquear a los canales de Na^+ persistentes y disminuir significativamente la frecuencia del disparo. Dichos fármacos actualmente son comercializados y utilizados clínicamente como neuroprotectores y anticonvulsivos, y por lo obtenido en este trabajo, podemos decir que al consumir dichos fármacos, simultáneamente puede estar disminuyendo la actividad eléctrica espontánea en las células cromafines, con lo cual, puede verse afectado los niveles basales de catecolaminas.

Debido a que los canales de Na^+ sensibles a TTX son bloqueados por los fármacos antes mencionados, atribuimos que la aplicación de fenitoína, riluzole y vinpocetina disminuye la amplitud de la espiga de corrientes de potenciales de acción espontáneos, debido a un bloqueo de los canales de Na^+ sensibles a TTX, sumado al efectos sobre los canales de Na^+ persistentes.

Con base en estos resultados podemos concluir que los canales de Na^+ persistentes se encuentran presentes y además participan en la generación de actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata recién nacida.

Estos resultados dan pauta a seguir una nueva línea de investigación para demostrar si durante ésta etapa del desarrollo, se expresa una corriente de Na^+ persistente, la cual no se ha demostrado que exista en células cromafines de rata adulta, ya que solo se ha reportado que se encuentra presente una corriente de Na^+ sensible a TTX y que a concentraciones de magnitudes nM es capaz de inhibirse (Neely A. 1990).

Con estos resultados, creemos que es necesario llevar a cabo un mayor número de experimentos, como registros de fijación de voltaje y de fijación de corriente que nos permitan evaluar los mecanismos que determinan la participación de los canales de Ca^{2+} tipo T y de Na^+ persistentes en las células cromafines de rata durante las primeras etapas del desarrollo. Y de ahí extender nuestras maniobras experimentales en otras etapas del

desarrollo para aclarar el origen de la actividad eléctrica en las células cromafines de rata.

Por otra parte, en estudios aún no publicados en el laboratorio del Dr. Arturo Hernández Cruz, se ha demostrado por medio de inmunocitoquímicas la existencia de canales de Ca^{2+} tipo T y de Na^+ persistentes en las membranas de células cromafines, lo cual refuerza nuestros resultados.

9. CONCLUSIONES

Con base en nuestros resultados, hemos demostrado lo siguiente:

- La aplicación de TTX produce una disminución no significativa de la frecuencia de disparo de corrientes de potenciales de acción espontáneos; en cuanto a la amplitud de la espiga, ésta se redujo significativamente. Sin embargo, la actividad eléctrica espontánea se mantiene.
- Los canales de Ca^{2+} tipo T, están implicados en la regulación y generación de la frecuencia de disparo de corrientes de potenciales de acción espontáneos, debido a que el bloqueo de canales de Ca^{2+} tipo T con Mibefradil reduce significativamente la frecuencia de disparo después de que TTX ha bloqueado los canales de Na^+ dependientes de voltaje. Por otra parte, Mibefradil no tuvo efecto sobre la amplitud de la espiga de corrientes de potenciales de acción espontáneos.
- La incubación de células cromafines de rata recién nacidas con AMPc produjo una reducción drástica de la frecuencia de disparo de las corrientes de potenciales de acción espontáneos comparadas con las células que no recibieron el tratamiento. Respecto a la amplitud de la espiga de corrientes de potenciales de acción espontáneos, incrementó alrededor de 3 veces en las células tratadas con AMPc en relación a las células no tratadas.
- La aplicación de fenitoína, riluzole y vinpocetina, fármacos que ejercen sus efectos al bloquear canales de Na^+ persistentes, reducen significativamente la frecuencia de disparo así como la amplitud de la espiga de corrientes de potenciales de acción en células cromafines de rata recién nacida en cultivo. Demostrando entonces, que la actividad de estos canales durante los primeros días de nacimiento ayudan a generar actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata.

Por lo tanto, los canales de Ca^{2+} tipo T, los canales de Na^+ persistentes y los canales de Na^+ sensibles a TTX promueven la generación de actividad eléctrica espontánea en células cromafines de rata recién nacida en cultivo.

10. REFERENCIAS

- Aidley D J. The Physiology of Excitable Cells. 3 ed. Cambridge University Press, New York. 1989.
- Arteledo A R. Electrical Properties of Adrenal Chromaffin Cells. Capitulo 12 en: "The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells". Scherübl H y Hescheler J Editores. CRC press. 1995
- Barry P H, Lynch J W. Action Potentials Initiated by Single Channels Opening in a Small Neuron (rat olfactory receptor). *Biophys. J.* 55: 755-768, 1989.
- Barbour B, Isope P. Combining loose cell-attached stimulation and recording. *J. Neurosci. Meth.* 103: 199-208, 2000.
- Bean B P. Classes of Calcium Channels in Vertebrate Cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51:367-384. 1989.
- Becherer U, Moser T, Stümer W, Oheim M. Calcium Regulates Exocytosis at the Level of Single Vesicles. *Nat. Neurosci.* 8: 846-853,. 2003.
- Beltran P L, Charles A. Riluzole inhibits spontaneous Ca^{2+} signaling in neuroendocrine cells by activation of K^{+} channels an inhibition of Na^{+} channels. *Br. J. Pharmacol.* 40 (5): 881-888, 2003.
- Beurrier C, Bernard B, Hammond C. Slowly inactivating Sodium Current (IN_{AP}) Underlies Single-Spike activity in rat Subthalamic Neurons. *J. Neurophysiol.* 83: 1951-1957, 2000.
- Bönöczk P, Gulyás B, Adam V V, Nemes A, Kárpáti E, Kiss B, Kapás M, Szántay C, Koncz I, Zelles T, Vas A. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: Effect of vinpocetine. *Brain Research Bulletin* 52 (3): 245-254, 2000.
- Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, Shimahara T. Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J. Physiol.* 537 (1): 35-44, 2001.
- Brandt B L, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S. Action potentials in the rat cromafin cell and effects of Acetylcholine. *J. Physiol.* 263: 417-439, 1976.
- Carbone E, Lux H D. A low voltage-activated fully inactivating Ca^{2+} channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 310: 501-502, 1984.
- Catterall W A. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16: 521-555, 2000.

Coupland R E. The natural history of the chromaffin cell - twenty five years on the beginning. *Arch. Histol. Cytol.* 52: 331-341, 1989.

Crill W E. Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 349-362, 1996.

Chevalier M, Lory P, Mironneau C, Macrez N, Quignard J F. T-type $Ca_v3.3$ calcium channels produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations. *Eur. J. Neurosci.* 23: 2321-2329, 2006.

Darbon P, Yvon C, Legrand J C, Streit J. INa_P Underlies intrinsic spiking and rhythm generation in networks of cultured rat spinal cord neurons. *Eur. J. Neurosci.* 20: 976-988, 2004.

Delmas P, Raggenbass M, Gola M. Low-threshold Na^+ currents: a new family of receptor-operated inward currents in mammalian nerve cells. *Brain Research Reviews* 25: 246-254, 1997.

Douglas W W. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: 453-474, 1968

Escobedo L Y. Oscilaciones del potencial de membrana en células cromafines. Tesis de Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. UNAM, 2006.

Fenwick E M, Marty A, Neher E. Sodium and Calcium Channels in Bovine Chromaffin Cells. *J. Physiol.* 331: 599-635, 1982.

Giancippoli A, Carabelli V, Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carbone E. Exocytosis associated to T-type channels recruited by prolonged cAMP exposure in rat chromaffin cells. *J. Biophys.* 86: 233A, 2004.

Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V. Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited $Ca_v3.2$ ($\alpha 1H$) channels in rat chromaffin cells. *J. Biophys.* 90: 1830-1841, 2006.

Grimaldo Avilés J I. Glándula Suprarrenal. Capítulo VIII.5 en: Fisiología: células, órganos y sistemas. Muñoz Martínez E J, García X. Ediciones Científicas Universitarias, México 1997.

Gunning P W, Letourneau P C, Landreth G E, Shooter E M. The action of nerve growth factor and dibutyryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate on rat pheochromocytoma

reveals distinct stages in the mechanism underlying neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 1(10): 1085-1095, 1981a.

Guning P W, Landreth G E, Bothwell M A, Shooter E M. Differential and synergistic actions on nerve growth factor and cyclic AMP in PC12 cells. *J. Cell. Biol.* 89(2): 240-245, 1981b.

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

Hernandez-Cruz A, Pape H. C. Identification of two calcium currents in acutely dissociated neurons from the rat lateral geniculate nucleus *J. Neurophysiol.* 61:1270-1283, 1989.

Hille B. Ions channels of excitable membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland , MA, 2001.

Hollins B, Ikeda S R. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J. Neurophys.* 72 (2): 1195-1211, 1996.

Huguenard J R, Prince D A. A novel T-type currents prolonged Ca^{2+} -dependent burst firing in GABAergic neurons of rat Thalamic Reticular Nucleus. *J. Neurosci.* 12: 3804-3817, 1992.

Huguenard J R. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 329-348, 1996.

Jinno S, Ishizuka S, Kosaka T. Ionic currents underlying rhythmic bursting of ventral mossy cells in the developing mouse dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 17: 1338-1354, 2003.

Jordan J. Avances en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. *OFFARM.* 22(3): 102-112, 2003.

Kandel E R, Schwartz J H, Jessell T M. Principles of Neural Science. McGraw-Hill Co. New York, 2000.

Kidokoro Y, Ritchie A. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J. Physiol.* 307: 199-216, 1980.

Landsberg L, Young J B. Catecholamines and the adrenal medulla. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J D & Foster D W. W. B. Saunders Company, 1992.

Lee J H, Gomora J C, Cribbs L L, Pérez-Reyes E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block $\alpha 1H$. *J. Biophys.* 77: 3034-3042, 1999.

Li B; Schild J H. persistent tetrodotoxin-resistant Na^+ currents are activated by prostaglandin E2 via cyclic AMP-dependent pathway in C-type nodose neurons of adult rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20; 355 (4): 1064-1068, 2007.

Malgaroli A Fesce R, Meldolesi J. Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 2,4,5-triphosphate elevations but are generated by caffeine and ryanodine-intracellular Ca^{2+} store. *J. Biol. Chem.* 265(6): 3005-3008, 1990.

Matteson D R. Armstrong C M. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J. Gen. Physiol.* 87: 161-182, 1986.

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.

Nassar-Gentina V, Pollard H B, Rojas E. Electrical activity of chromaffin cells of intact mouse adrenal. *Am. J. Physiol.* 253 (Cell Physiol. 23): C675-C683, 1988.

Neely A. Voltage-clamp study of cultured rat Chromaffin cells and their response to muscarine. Tesis de Doctorado. The Florida State University, 1990

Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giaccipoli A, Carbone E. Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca_v3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J. Physiol.* 558: 433-449, 2004.

Ogata N, Yoshiaki O. Molecular diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na^+ Channels. *Jpn. J. Pharmacol.* 88: 365-377, 2002.

Pacheco-Cano M T, Garcia-Hernandez F, Hiriart M, Komisaruk B R & Drucker-Colin R. Dibutyryl cAMP stimulates analgesia in rats bearing a ventricular adrenal medulla transplant. *Brain Res.* 531, 290-293, 1990.

Pérez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.* 83: 117-161, 2003.

Role L W. Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 254-262, 1992.

Sakmann B, Patlak J, Neher E. Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* 286 (5768): 71-73, 1980.

Sankaranarayanan S, Simasko S. A role for a background sodium current in spontaneous action potentials and secretion from rat lactotrophs. *Am. J. Physiol.* 271 (Cell Physiol 40): C1927-C1934, 1996.

Sargent P B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 403-443, 1993.

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

Stafstrom C E. Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Curr.* 7 (1): 15-22, 2007.

Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Differential inhibition by Riluzole, Lamotrigine, and Phenytoin of sodium and calcium currents in Cortical Neurons: Implications for Neuroprotective Strategies. *Experimental Neurology* 147: 115-122, 1997.

St-John W M, Waki H, Dutchmann M, Paton J F. Maintenance of eupnea of in situ and in vivo rats following riluzole: a blocker of persistent sodium channels. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 15; 155(1): 97-100, 2007.

Thorne Research Inc. Vinpocetine (Monograph). *Alternative Medicine Review.* 7(3): 240-243, 2002.

Tischler A S. Chromaffin cells as Model of Endocrine Cells and Neurons. *Ann. NY Acad. Sci.* 971: 366-370, 2002.

Tortora G J, Grovowski S. Principios de Anatomía y Fisiología. Capítulos 12, 17 y 18. OXFORD. 9 edición, 2002.

Trifaró J M. Molecular Biology of the Chromaffin Cell. *Ann. NY Acad. Sci.* 971: 11-18, 2002

Urbani A, Belluzi O. Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3567-3574, 2000.

Van Goor F, Krsmanovic L Z, Catt K J, Stijilkovic S S. Control of Action Potential-Driven Calcium Influx in GT1 Neurons by the Activation Status of Sodium and Calcium Channels. *Mol. Endo.* 13 (4): 587-603, 2006.

Van Goor F, Differential expression of ionic channels in rat anterior pituitary cells. *Mol. Endo.* 15 (7): 1222-1236, 2001.

Verdugo D L. Médula suprarrenal. Capítulo 50 en: “Fisiología Médica”. Drucker C R. Editorial El Manual Moderno, México 2005.

Yamakage M, Namiki A. Calcium Channels – basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels – a review. *Can. J. Anesth.* 49 (2): 151-164, 2002.

Yokoo H, Shiraishi S, Kobayashi H, Yanagita T, Yamamoto R, Wada A. Selective inhibition by Riluzole of voltage-gated sodium channels and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 357: 526-531, 1998.

Yuhi T, Wada A, Yamamoto R, Yanagita T, Hiromi N. Up-regulation of functional voltage-dependent sodium channels by cyclic AMP-dependent Protein kinase in adrenal medulla. *Brain. Res.* 709:37-43, 1996.

Zhou X, Dong X W, Crona J, Maguire M, Priestley T. Vinpocetine is a potent blocker of rat Nav1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channel. *The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 306: 498-504, 2003.