



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Modulación autócrina y parácrina de la corriente de
Calcio por ATP y opioides en células cromafines de rata**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

**ALEJANDRE GARCÍA MARÍA MILDRED
TZITITLINI**



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Arturo Hernández Cruz
(2010)**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

"Felicidad no es hacer lo que queremos, sí no querer lo que hacemos"

"La única lucha que se pierde es la que se abandona."

Ernesto che Guevara

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 102085, DGAPA-UNAM 79763.

**A MIS PADRES:
Adelaida García Cortes
Jose Juan Alejandro Gonzales
Todos mis logros, todo mi amor, toda la vida,
Todo mi yo.**

**Con Todo mi amor, agradecimiento y admiración
A Felipe Pérez Rueda**

A mis hermanos: Pablo, Yolitzin y Maximo. Con mucho cariño y agradecimiento.

A mis Abuelos, mis Tios y primos por la excelente familia que me han dado.

A mi familia del laboratorio: Tatiana, Nicolás, Mariana, Claudia Pedro, Adán, Luisa, Omar, Luis, Diana, Vladimir, el nuevo integrante Daniel, Por su confianza, ayuda y por esos excelentes momentos.

A mis amigos: Angelica, Antonio, Cesar, Abraham, Erandi, Ursula, Duyadi, Alicia, María, Guillermo, Ruben, Jose Alfredo, Avelino, Carlos, Roberto.

A mi familia de natación: Juan Cruz, Alberto, Eduardo, Angel, Alejandro, Yeshu, Rodrigo Pitalua, Rodrigo, Alejandra, Adriana, Virgilio.

Mi eterno agradecimiento al Dr. Arturo Hernández Cruz por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio, sobre todo por su apoyo, tolerancia y toda la confianza que me brindo.

A los revisores de ésta tesis: Dra. Maria Luisa Fanjul Peña, Dra. Elvira Galarraga Palacios, Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y Dr. León David Islas Suárez.

Gracias por sus observaciones y por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Gracias a el Biol. Pedro Segura Chama y al Dr. Adán Hernández Cortés por todo el apoyo que me brindaron, su dedicación su confianza y sobre todo gracias por su amistad.

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina	SNE	sistema nervioso entérico
ATP	5'-trifosfato de adenosina	SNA	sistema nervioso autónomo
CCs	células cromafines	TEA	tetraetilamonio
CCDV_s	canales de calcio dependientes de voltaje	TTX	tetrodotoxina
COMT	catecol-O- metiltransferasa		
DAMGO	[D-Ala ₂ , N-Me-Phe ₄ , Gly ₅ -ol]		
DMSO	dimetil sulfóxido		
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G		
GΩ	giga ohmio		
HVA	alto umbral de activación (High Voltage Activated)		
IP₃	inositol 1,4,5-trifosfato		
KHz	kilo hertz		
LVA	bajo umbral de activación (Low Voltage Activated)		
MAO	oxidasa de monoaminas		
μg	microgramos		
min	Mínuto		
μM	micromoles por litro		
μm	micrómetro		
ms	milisegundo		
mV	milivoltio		
mAChR	receptores muscarínico de acetilcolina		
nAChR	receptores nicotínicos de acetilcolina		
NPG	neurona preganglionar		
nm	nanómetro		
pA	pico amperio		
PA	potencial de acción		
pF	pico faradios		
PTX	toxina pertussis		
pH	potencial de hidrógeno		
PNMT	feniletanolamina N-metil transferasa		
s	segundo		
SVL	lisado vesicular soluble (soluble vesicle lysate)		
SNC	sistema nervioso central		
SNP	sistema nervioso periférico		
SNS	sistema nervioso simpático		

Índice General	Página
1. Resumen	
2. Introducción	
2.1 El sistema nervioso simpático.	1
2.2 La glándula suprarrenal (Anatomía, morfología y fisiología).	2
2.3 Células Cromafines (CCs).	3
2.4 Irrigación de la glándula suprarrenal en humanos.	4
2.5 Inervación de la glándula suprarrenal.	5
2.6 Implicaciones fisiológicas de las catecolaminas.	5
2.7 Biosíntesis de catecolaminas.	7
2.8 Secreción de catecolaminas.	8
2.9 Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.	10
3. Antecedentes	
3.1 Modulación de los canales de calcio.	13
3.2 Inhibición de los canales de Ca ²⁺ por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).	14
3.3 Expresión heterogénea de la modulación inhibitoria en canales HVA.	16
3.4 Inhibición de los CCDVs por neurotransmisores autoliberados.	17
3.5 Experimentos con parada de flujo (modulación Autócrina).	18
3.6 Liberación endógena de neurotransmisores modula la I _{Ca²⁺} en CCs.	19
3.7 Modulación de los canales de Ca ²⁺ en células agrupadas.	19
4. Justificación	21
5. Hipótesis	22
6. Objetivo General	23
6.1 Objetivos Particulares	23
7. Materiales y Métodos	24
7.1 Obtención de rebanadas de glándula adrenal	24
7.2 Soluciones	24
7.3 Registro de la corriente y adquisición de datos	25
7.4 Análisis estadístico.	27
8. Resultados	28
Aislamiento de la I _{Ca²⁺} en CCs en rebanadas de glándula adrenal de rata.	
8.1 La parada de flujo modula la I _{Ca²⁺} de una manera autócrina/parácrina por neurotransmisores endógenos liberados.	28
8.2 Activación de los receptores purinérgicos por ATP disminuyen la I _{Ca²⁺} .	31
8.3 Activación de los receptores opioidérgicos por Leucina-encefalina disminuyen la I _{Ca²⁺} .	32
8.4 Modulación de la I _{Ca²⁺} por ATP y Leu-enc.	34
8.5 Bloqueo de los receptores P _{2Y} purinérgicos y μ- y δ-opioidérgicos evitan la	

modulación de la $I_{Ca^{2+}}$.	35
8.6 Efecto de ATP y Leu-enc en la $I_{Ca^{2+}}$ Dependiente de voltaje.	39
9. Discusión	41
10. Conclusión	46
11. Bibliografía	47

RESUMEN

Las células cromafines (CCs) de la médula adrenal liberan catecolaminas al torrente sanguíneo ante una situación de estrés. Estudios realizados en CCs en cultivo han mostrado que además co-liberan ATP y opioides, componentes que inhiben las corrientes de calcio ($I_{Ca^{2+}}$) mediante la activación de receptores P_{2y} purinérgicos, μ y δ opioidérgicos respectivamente. La rebanada de glándula adrenal es un modelo idóneo para el estudio de la modulación endógena de $I_{Ca^{2+}}$ dependiente del voltaje debido a que se preserva su microambiente fisiológico. En este trabajo determinamos la modulación autócrina/parácrina de la corriente macroscópica de calcio en CCs en la rebanada de médula adrenal de rata. Utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula entera, se aplicaron pulsos despolarizantes a 0 mV (50 ms de duración) partiendo de un potencial de mantenimiento de -80 mV. La modulación dependiente de voltaje de la $I_{Ca^{2+}}$ se evaluó a través de la corriente recuperada por medio de pre-pulsos despolarizantes a +80 mV precediendo al pulso de prueba.

Se identificó que en condiciones basales la $I_{Ca^{2+}}$ esta modulada de manera dependiente de voltaje la cual fue recuperada por pre-pulso. Al detener el flujo de la perfusión con la finalidad de aumentar la concentración de los productos de secreción endógena, la $I_{Ca^{2+}}$ disminuyó significativamente, el componente dependiente de voltaje fue recuperado por pre-pulso.

Por otra parte, la adición exógena de ATP y leucina-enkefalina (agonistas de receptores P_{2y} y μ , δ -opioidérgicos respectivamente) disminuyeron significativamente la $I_{Ca^{2+}}$ de la cual la mayor parte corresponde al componente dependiente de voltaje. El bloqueo de los receptores P_{2y} mediante la adición de suramina (antagonista P_{2y}) incrementó la $I_{Ca^{2+}}$, pero el componente dependiente de voltaje no aumentó significativamente respecto a la basal. En presencia de suramina, la adición de ATP provocó una ligera disminución de la corriente dependiente del voltaje. En cuanto al bloqueo de los receptores opioidérgicos mediante la aplicación de naloxona (antagonista de los receptores μ , y δ -opioides), no se observó efecto sobre la $I_{Ca^{2+}}$ y tampoco afectó la modulación basal dependiente de voltaje; sin embargo, la disminución producida por leucina-enkefalina fue completamente bloqueada en presencia naloxona.

La inhibición basal de $I_{Ca^{2+}}$ encontrada en este estudio, así como la inhibición autócrina y/o parácrina por la liberación de neurotransmisores, puede ser fisiológicamente relevante en la regulación de la exocitosis de las CCs en situaciones de estrés, evitando la liberación descontrolada de catecolaminas, la cual podría ser letal. La disminución de $I_{Ca^{2+}}$ por activación de los receptores P_{2y} , μ y δ involucra principalmente un mecanismo dependiente de voltaje.

1. Introducción

El sistema nervioso se compone de dos subsistemas principales: sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está formado por el encéfalo y médula espinal, los cuales integran y correlacionan la información sensorial; mientras que, el SNP incluye: los nervios craneales, nervios raquídeos, ganglios y receptores sensoriales. El SNP se subdivide en sistema nervioso somático (SNS), entérico (SNE) y autónomo (SNA). Siendo el SNA el de mayor interés para el desarrollo de este trabajo.

El SNA está formado por neuronas sensoriales que transmiten al SNC la información proveniente de los receptores sensoriales autónomos, situados en las vísceras y neuronas. Las neuronas motoras del SNC conducen impulsos nerviosos a músculo liso, miocardio, glándulas y tejido adiposo regulando la actividad de estos sistemas, controlando y manteniendo el medio interno de un organismo estable. El SNA se divide en sistema nervioso simpático y parasimpático. En la mayoría de los casos los órganos efectores reciben inervación simpática y parasimpática y generalmente tienen acciones fisiológicas opuestas. Por ejemplo, las neuronas simpáticas aumentan la frecuencia cardíaca, mientras que las parasimpáticas la disminuyen (Tortora y Grabowski, 2006; Verdugo, 2005; Berne, 2006). Así por ejemplo, mientras que la función principal del sistema parasimpático es mantener un estado corporal de descanso o relajación, la activación del sistema simpático ocurre durante situaciones de estrés físico o emocional (Tortora y Derrickson, 2006).

2.1 *El sistema nervioso simpático*

El sistema nervioso simpático está formado por un circuito de dos neuronas: la primera neurona conocida como neurona preganglionar (NPG), cuyo soma se encuentra en el encéfalo o en la médula espinal (astas laterales de la sustancia gris en los doce segmentos torácicos) la cual proyecta su axón que normalmente se extiende hasta un ganglio autónomo donde hace sinápsis con una neurona posganglionar, que corresponde a la segunda neurona de la vía autónoma, mismas que proyectan hasta los órganos efectores (Tortora y Derrickson; 2006).

Una de las glándulas que recibe inervación del SNA es la glándula suprarrenal. A la unidad formada por estos componentes se denomina “eje simpato-adrenal”, el cual se encarga de mantener la homeostasis corporal durante la exposición a estímulos extremos (Landsberg y Young, 1980). En el caso de las glándulas suprarrenales las neuronas preganglionares del SNA inervan directamente a las células de la médula suprarrenal (Berne y Levy, 2006).

2.2 *La glándula suprarrenal (Anatomía, morfología y fisiología)*

Las glándulas suprarrenales o glándulas adrenales son dos órganos endocrinos como su nombre lo indica, son pequeñas estructuras situadas sobre la parte superior de cada riñón de forma piramidal (Fig. 1); descritas por primera vez en 1563 por Bartholomeo Eustachius como la “Glandulae renis incumbentes”, editado y publicado hasta 1774 por Lancisius. 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 (Coupland, 1965). En los mamíferos, la glándula se compone de dos partes diferenciadas anatómica y funcionalmente, la corteza y la médula (Emil Huschke, 1797–1858; Scoenwetter et. al., 1968); estas estructuras tienen un origen embrionario, estructura y funciones totalmente diferentes. (Tortora y Grabowski, 2002; Verdugo, 2005; Grimaldo Avilés 1997).

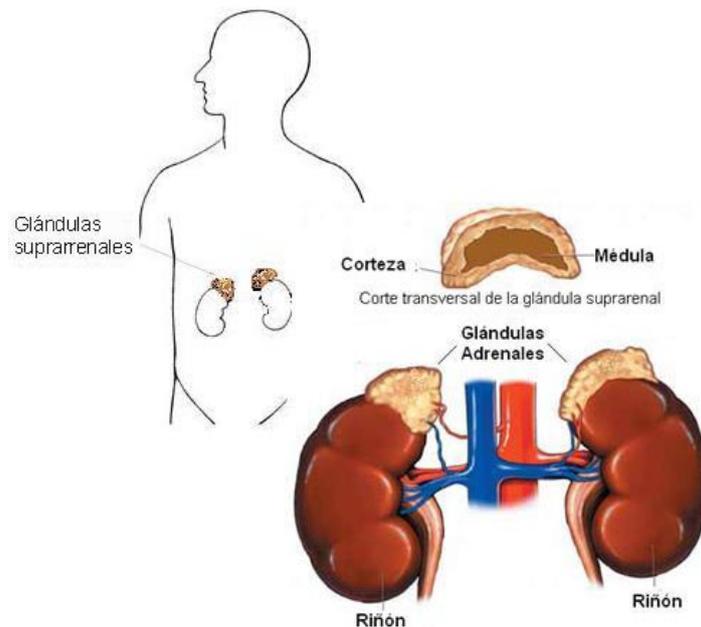


FIG. 1. Ilustración de la ubicación anatómica y morfología de la glándula adrenal.

Arnold en 1866, diferenció morfológicamente las tres zonas de la corteza. La corteza derivada del mesodermo se divide en tres zonas celulares de acuerdo a su morfología y su mecanismo enzimático. De la superficie hacia el interior: a) zona externa o *glomerulosa*, sintetiza y secreta mineralocorticoides que tienen efectos en la homeostasis del agua y electrolitos; b) zona media o *fasciculata*, es la más voluminosa, sus células sintetizan y secretan glucocorticoides, tienen efectos en la homeostasis de la glucosa, entre otras funciones, y c) zona interna o *reticularis*, sus células sintetizan y secretan andrógenos con efectos masculinizantes. Todas estas hormonas adrenocorticales pertenecen al grupo de los esteroides y

son indispensables para la vida, ya que la deficiencia de las mismas puede causar la muerte por deshidratación y desequilibrio electrolítico (Tortora y Grabowski, 2002; Verdugo, 2005; Lockhart, 1988; Grimaldo Avilés, 1997).

A diferencia de la corteza, la médula suprarrenal tiene un origen embrionario neuroectodérmico. La médula proviene de la cresta neural y funciona como un tejido nervioso especializado para la secreción (Rudolph Albert y Kölliker en 1961 describió la formación fetal de la corteza y la subsecuente invasión por precursores neuronales de la médula) (Le Douarin y Teillet, 1974; Teillet y Le Douarin, 1974; Norman, 1997; Unsiker 2009). La médula adrenal esta compuesta de células cromafines (CCs) (Coupland, 1965; Perlman, 1977)

2.3 Células Cromafines

La CC (del griego *chroma* = color y del latín *affinis* = afín), se denominó así por la alta afinidad que tienen sus gránulos para teñirse con sales de cromo (potassium dichromate) (Kohn, 1902; Coupland, 1989 y Tischler 2002), las células se disponen en grupos arreglados en cordones conectados rodeando estructuras vasculares, sintetizan, almacenan y secretan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). (Perlman, 1977; Trifaró, 2002; Norman, 1997).

En la médula adrenal se distinguen CCs adrenérgicas y noradrenérgicas (Eränkö, 1952; Coupland, 1989), la diferencia entre ellas se encuentra en función de las catecolaminas que secretan, así por ejemplo, la adrenalina constituye hasta el 80 o 90% del total de la secreción, el resto es de noradrenalina. La diferencia bioquímica entre estos dos tipos celulares es por la presencia de una enzima adicional en las células adrenérgicas, denominada feniletanolamina N-metil transferasa (PNMT) por sus siglas en inglés (Coupland, 1972), que convierte la noradrenalina en adrenalina, ver Fig. 3 (Trifaró, 2002).

En 1953 Hillarp y colaboradores, Blaschko y Welch encontraron, que las catecolaminas se localizan predominantemente en una fracción particular del homogenizado adrenomedular, los gránulos cromafines. Los gránulos cromafines o vesículas constituyen los organelos más representativos y abundantes en las CCs y es donde se almacenan los productos de secreción, la diferencia morfológica más llamativa entre los dos tipos celulares es que el diámetro de los gránulos que contienen a las catecolaminas en células adrenérgicas oscila entre los 100 a 300 nm de diámetro (Stjarne, 1966; Smith y Winkler, 1972; Grimaldo, 1997) teniendo un contenido más homogéneo y una mayor densidad de material, que en las noradrenérgicas con un diámetro de entre 10 y 60nm (Geffen y Livett, 1971; Bloom, 1972).

Brow-Séquard, 1856 y Addison, 1855 dieron evidencias de la importancia de la glándula adrenal por observaciones clínicas. Las CCs además de catecolaminas co-liberan neuropéptidos y purinas; dichas células vierten sus productos de secreción sin inervar tejido alguno al torrente sanguíneo con lo que sus neurotransmisores se comportan como hormonas, las cuales no son esenciales para la vida a diferencia de las adrenocorticales pero si son necesarias para reaccionar ante situaciones de estrés (Bernard, 1855; Schäfer, 1895; Trifaró, 2002; Tortora y Grabowski, 2002).

2.4 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, las cuales son ramas de la aorta, la arteria diafragmática inferior y la arteria renal, respectivamente. Ocasionalmente reciben arteriolas de las intercostales y de la arteria ovárica o la espermática (Ganong, 1957, Perlman, 1977).

La circulación en la glándula adrenal es compleja y suministra un caudal sanguíneo especial; mediante un sistema portal convergente formado por pequeñas arterias que se dirigen de la cápsula a la corteza y constituyen una red de arteriolas y capilares; la cual continúa con un sistema sinusoidal que se extiende radialmente hacia lagunas venosas ubicadas en la médula. Las vénulas se reúnen en una gran vena central que atraviesa la glándula; en el lado derecho desemboca hacia la vena cava inferior y el izquierdo sobre la vena renal (Perlman, 1977; Hamaji, 1985).

La importancia de este sistema de vascularización es que permite la llegada de secreciones de la corteza a la médula, como concentraciones elevadas de glucocorticoides que favorecen la síntesis de la enzima de la médula suprarrenal, la PNMT (Wurtman, 1966; Tortora y Grabowski, 2002; Grimaldo, 1997). Por lo tanto la capacidad de secreción de adrenalina de la médula adrenal se beneficia de los eventos que ocurren en la corteza (Lockhart y Hamilton, 1988 y Norman, Litwack, 1997).

2.5 *Inervación de la glándula suprarrenal*

En relación con su tamaño, las glándulas suprarrenales tienen una gran inervación (Verdugo, 2005). Los axones que inervan a las CCs emergen de las NPG, el soma de las NPG se encuentra en la médula espinal y su axón emerge de las astas laterales de los segmentos T: 5-10 (Torácicos) y L: 1 y 2 (Lumbares), cuyas fibras de neuronas preganglionares (nervio esplácnico) inervan directamente a las CCs de médula suprarrenal (Landsberg y Young, 1980; Moskowitz, 1977). También recibe inervación de un plexo de origen adrenocortical que penetra a la médula formando haces, que en su interior se ramifican profusamente y forman terminales sinápticas alrededor y entre las células (Figura 2). Las neuronas preganglionares liberan acetilcolina (ACh) como neurotransmisor químico que estimula la liberación de catecolaminas de las CCs a la circulación (Levy y Blattberg, 1976; Trifaró, 2002; Tortora y Derrickson, 2006).

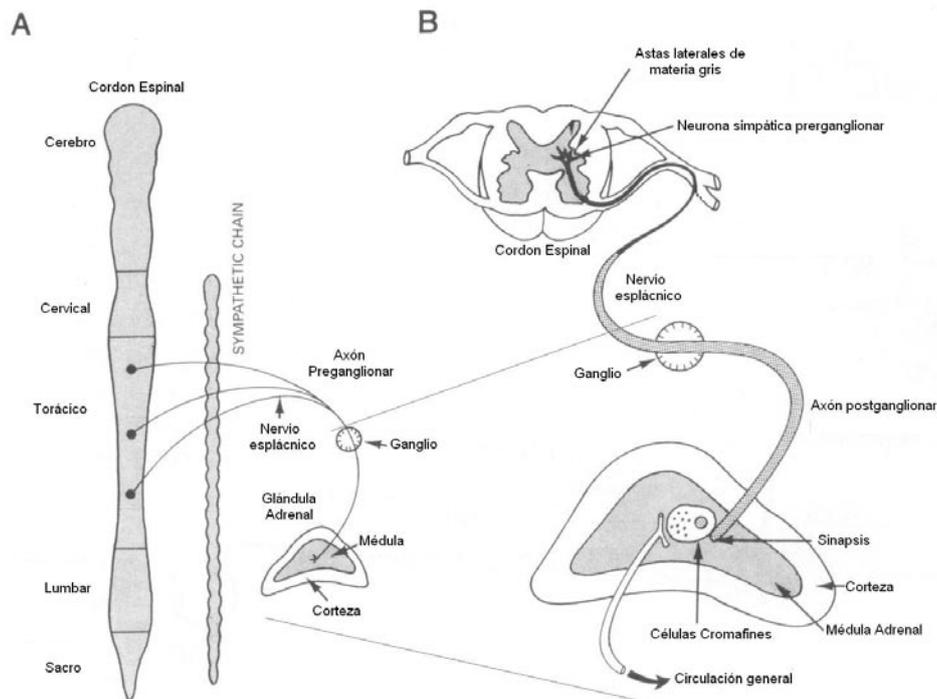


FIG. 2. Inervación de la glándula suprarrenal (Modificado de: Norman, 1997)

2.6 *Implicaciones fisiológicas de las catecolaminas*

Durante el estrés físico o emocional se produce la liberación de catecolaminas, hormonas de la médula suprarrenal que ponen en marcha una serie de respuestas fisiológicas para la regulación de múltiples procesos biológicos. Uno de los más importantes es la respuesta de lucha-huida descritas por Cannon en 1929, las catecolaminas liberadas circulan por todo el cuerpo, teniendo efecto en todos aquellos tejidos que expresan receptores denominados

adrenérgicos de los cuales existen dos familias: alfa y beta (Heinsimer y Lefkowitz, 1982; Pollet y Levey, 1980; Insel, 1984; Tortora y Derrickson, 2006). Ahlquist en 1948 caracterizó y diferenció las respuestas de una serie de agonistas adrenérgicos, prediciendo la existencia de dos tipos de receptores. 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 (Furchgott, 1972; Jenkinson, 1973; Grimaldo, 1997; Verdugo, 2005). En la tabla 1 se muestran los efectos que tienen las catecolaminas en diferentes órganos.

Las situaciones de miedo y ansiedad, la hipoglucemia, hipotensión o la hipotermia, promueven la secreción de catecolaminas de las CCs. Además otros efectos que promueven la liberación de catecolaminas, se presentan mediante estímulos químicos por vía hemática que logran llevar sustancias como la histamina, bradicinina o la angiotensina II, liberadas en situaciones de alergia e hipotensión respectivamente.

Las catecolaminas son eliminadas en minutos de los diferentes compartimientos celulares por mecanismos: recaptura, degradadas por oxidasas de monoaminas (MAO por sus siglas en inglés). Las catecolaminas son degradadas por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Tipton, 1973). Este mecanismo de degradación se interpreta como una protección del organismo frente a una liberación excesiva de catecolaminas que puede ser potencialmente letal (Verdugo, 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_3	Estimula la gluconeogénesis e inhibe síntesis

			de glucógeno
	Hígado		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		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	Eyacuación
Útero		β_2	Relajación en útero preñado y no preñado
		α_1	Contracción en útero preñado

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

2.7 Biosíntesis de catecolaminas

La síntesis de catecolaminas se predijo en 1939 después del descubrimiento de la enzima Dopamina descarboxilasa, confirmando esto subsecuentemente *in Vitro* en 1957 por Ganon. En las CCs, el proceso de síntesis de catecolaminas: dopamina, noradrenalina y adrenalina comienza con la **fenilalanina** al hidroxilarse en el hígado forma **Tirosina** (Vaccro et. al., 1980), la cual es transportada por vía sanguínea al fluido extracelular de la médula suprarrenal, penetra a la célula por procesos activos, la tirosina es transformada por tirosina hidroxilasa en **dihidroxifenilalanina** (DOPA). Tirosina Hidroxilasa es la enzima que limita la síntesis de catecolaminas en todas las neuronas adrenérgicas (Perlman y Chalfie, 1977). **L-dopa** es convertida en dopamina por la L-aminoácido descarboxilasa localizada en el citosol (Lovenverg et al., 1962). La vía subsecuente después que la dopamina entra a los gránulos de secreción, es su hidroxilación por la beta-hidroxilasa a **noradrenalina** (Fig. 3) (Kaufman, 1965). En aproximadamente 10% de las CCs el proceso de síntesis termina en noradrenalina tal y como acontece en los nervios simpáticos, pero en las células restantes la noradrenalina se

convierte en **adrenalina**, la conversión es realizada dentro de los gránulos de secreción por la PNMT (Wurtman, 1966) y se utiliza a la S-adenosilmetionina como donador de metilo, todo esto se almacena hasta ser secretado (Norman A. y Liteack G., 1997, Ninomiya, 1995).

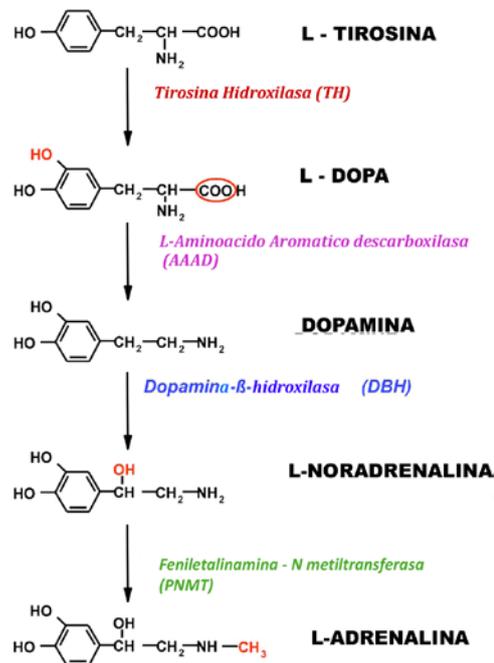


FIG. 3. Vía biosintética de las catecolaminas. La conversión de dopamina en noradrenalina se lleva a cabo dentro de las vesículas de secreción. (Modificado de: Unsiker, 2009).

2.8 *Secreción de catecolaminas*

Ambas glándulas adrenales de humano contienen aproximadamente 33 μM (6 mg) de catecolaminas en los gránulos cromafines (Perlman, 1977), en CCs hay alrededor de 10,000 a 30,000 vesículas, en las cuales Phillips (1987) identificó una variedad de sustancias mediadoras además de las catecolaminas en vesículas de CCs. Actualmente se sabe que en sus gránulos de secreción se almacenan y liberan catecolaminas, ATP, cromograninas (glicoproteínas ácidas) (Fischer-Colbrie et al., 1987) y encefálicas (Leucina-encefalina y metionina encefalina) al torrente sanguíneo por medio de la exocitosis estimulada por ACh liberada por el nervio esplácnico la cual estimula receptores colinérgicos (Yoshimasa et al., 1982; Viveros et al., 1982; Millhorn y Hokfelt, 1988; Burnstock, 1987; Norman, 1997 y Grimaldo, 1997, Douglas, 1968).

Es importante mencionar que todas las células conservan una diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, que en reposo es negativo del lado citosólico respecto del medio extracelular. Esta 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 cuales 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 CCs están presentes diferentes tipos de canales iónicos, entre ellos, canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Debido a sus similitudes estructurales y funcionales, principalmente por compartir la característica de ser sensibles al voltaje, se agrupan en la superfamilia de canales dependientes de voltaje (Hille, 2001), estos canales son activados durante la estimulación colinérgica proveniente del nervio esplácnico. Fisiológicamente la secreción de las CCs se lleva a cabo por la acción que ejerce la ACh a través de dos tipos de receptores: uno de tipo muscarínico (**mAChR**) y otro de tipo nicotínico (**nAChR**). Los primeros son receptores transmembranales acoplados a proteínas G los cuales promueven la liberación de Ca^{2+} mediante la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) el cual activa receptores de IP_3 induciendo la liberación Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Este aumento en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) modula la actividad de muchas proteínas intracelulares y transmembranales incluyendo a canales iónicos, participando también en el proceso de exocitosis (Douglas, 1965; Douglas y Rubin, 1961).

Por otra parte los **nAChR** son receptores ionotrópicos no selectivos, que al ser activados por ACh, inducen la despolarización de las células por el incremento en la permeabilidad de iones Na^+ , Ca^{2+} al interior y K^+ al exterior celular (Douglas, 1968; Sakmann, 1980; Role, 1992; Sargent, 1993), lo cual suscita un cambio despolarizante en el potencial de membrana que se encuentra alrededor de -60 y -40 mV (Hollins e Ikeda, 1996), si la despolarización alcanza el umbral de disparo del potencial de acción (PA), se genera uno o más PA. Durante la fase despolarizante del PA se activan canales de Na^+ entre -40 y -30 mV (Fig. 4) (Artalejo, 1995; Hollins, e Ikeda, 1996). Cuando el voltaje de membrana se aproxima a cero, los canales activos son los de Ca^{2+} de alto umbral de activación (P, Q, N, L, Fig. 4) que se activaron por la despolarización producida por los canales de Na^+ ; en esta fase del potencial se controla el influjo de calcio a la célula, proceso decisivo para que se lleve a cabo la fusión de los gránulos de secreción con la membrana para producir exocitosis.

La repolarización se da cuando los canales de Na^+ se inactivan, mientras que la despolarización activa gradualmente a los canales de K^+ dependientes de voltaje mientras que el Ca^{2+} que entró a la célula, activa la corriente de K^+ activada por Ca^{2+} de tipo BK (Lingle et

al., 1996). La hiperpolarización depende de la actividad de los canales BK y de los SK (Canales de K^+ activados por Ca^{2+}); los canales SK presentan mayor sensibilidad al Ca^{2+} con respecto a los BK (Fig. 4, Schlegel y Mollard, 1995).

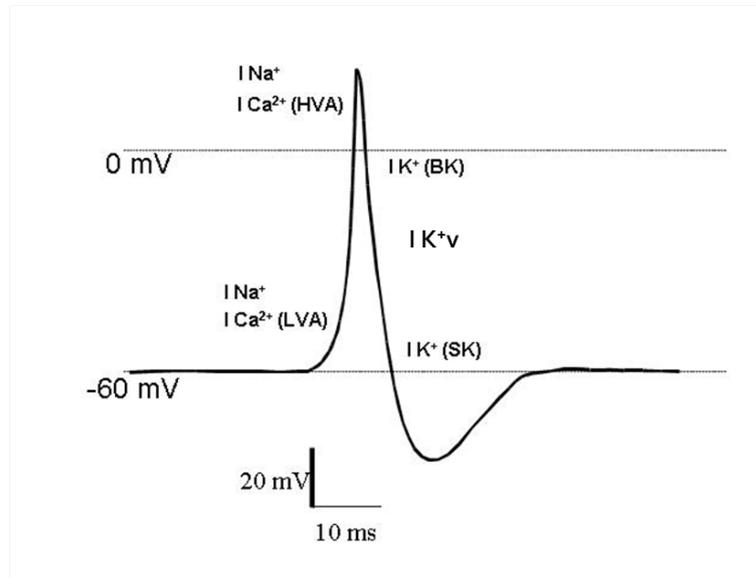


FIG. 4. Representación de un potencial de acción y las corrientes que lo generan. (Modificado de: Segura, Tesis de licenciatura, 2007)

2.9 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ es determinante para la exocitosis y un evento crucial para dicho incremento es la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDVs). Los CCDVs están formados de una subunidad α_1 y subunidades complementarias β , $\alpha_2\delta$ y γ . La subunidad α_1 está estructuralmente organizada en 4 dominios (I-IV), cada uno tiene 6 regiones transmembranales con el sensor de voltaje en la región 4, mientras que la región 5 y 6 forman el poro del canal (Catterall, 2000).

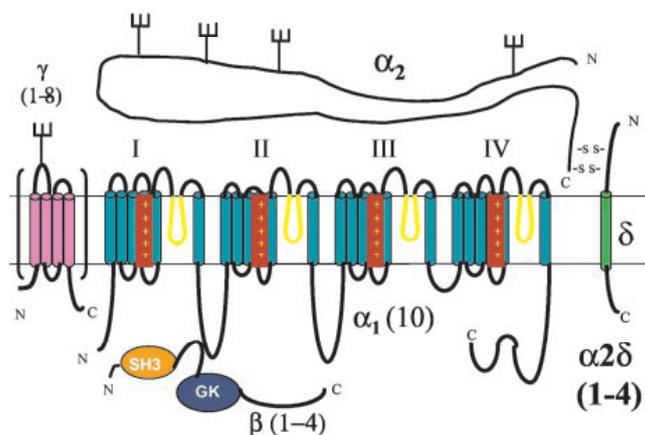


FIG. 5. Representación topológica de las subunidades de los Canales de Calcio Dependientes de Voltaje (CCDVs) (Dolphin, 2003).

La diversidad funcional entre los diferentes subtipos de canales de calcio puede ser explicada por la existencia de códigos genéticos de diferentes clases de subunidades $\alpha 1$ y β , así como diversos variantes de formas de un gen generado por splicing alternativo y la posible combinación entre las subunidades las cuales forman un canal complejo.

Inicialmente, los CCDVs se clasificaron en consideración del rango de voltaje que se requiere para su activación; en la década de los 80's se identificaron dos grupos de canales de Ca^{2+} , los de bajo umbral de activación o LVA (Low Voltage Activated) que presentan corrientes transitorias (tipo T) que se inactivan rápidamente y los de alto umbral de activación o HVA (High Voltage Activated) que presentan corrientes con lenta inactivación (tipo L) y otros tipos de corriente tipo N, P, Q y R (Bean, 1989; Carbone y Lux, 1984; Matteson y Armstrong, 1986). Actualmente se ha establecido 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, $\text{Ca}_v1.2$: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L codificado por la subunidad $\alpha 1 \text{ C}$ (Ertel et al 2000). La Tabla 2 muestra la clasificación de los CCDV.

Tipo de canal de calcio				
Dependencia de voltaje	Nomenclatura	Isoforma	Tipo de corriente	Bloqueadores
HVA	Cav 1.1	$\alpha 1\text{S}$	L	Nifedipine
	Cav 1.2	$\alpha 1\text{C}$		Nisoldipine
	Cav 1.3	$\alpha 1\text{D}$		Calcicludine
	Cav 1.4	$\alpha 1\text{F}$		Nifedipine
	Cav 2.1	$\alpha 1\text{A}$	P/Q	ω -Aga-IVA Cerebellum
				ω -Ctx-MVIIC Pituitary
				ω -Ctx-MVIID
		$\alpha 1\text{B}$	N	ω -Ctx-GVIA
	Cav 2.2	$\alpha 1\text{E}$	R	ω -Ctx-MVIA
	Cav 2.3			SNX-482
LVA	Cav 3.1	$\alpha 1\text{G}$	T	Mibefradil
	Cav 3.2	$\alpha 1\text{H}$		
	Cav 3.3	$\alpha 1\text{I}$		
		$\alpha 1\text{I}$		

Tabla 2. Subtipos de canales de calcio (García, 2006).

Douglas en 1968, propuso el término estímulo-secreción como fundamento de la secreción hormonal y de neurotransmisores siendo el Ca^{2+} el factor más importante entre el estímulo y la respuesta exocitótica. En todas las células endocrinas, los pasos para la secreción de hormonas son regulados en respuesta a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fisiológicamente la estimulación genera una elevación súbita de 0.1 - 50 μM , el cual depende de la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares y la entrada de Ca^{2+} a través de canales en la membrana celular (Schlegel y Mollard, 1995; Antonio Garcia, 2006). Este incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoca la aceleración del transporte de vesículas por el citoesqueleto distribuidas en microdominios inmediatos a la membrana (Trifaró, 1985). Promoviendo la fusión de dichos gránulos a la membrana para liberar sus contenidos (Landsberg, 1976; Becherer, 2004). Por lo cual la entrada de calcio a la célula a través de los CCDV es un proceso fundamental para que se lleve a cabo la exocitosis y la manera en que se regula este fenómeno por medio de neurotransmisores es el tema de estudio de este trabajo.

3. Antecedentes

Desde 1929, Cannon describió la función fisiológica de las CCs, la cual consiste en la liberación de catecolaminas por medio de exocitosis a la circulación en respuesta al estrés. Douglas en 1961 demostró que el proceso de exocitosis es dependiente de Ca^{2+} . Por otra parte, debido a que estas células contienen todos los elementos requeridos para el control espacial y cinético de los transientes de Ca^{2+} requeridos durante los pasos de exocitosis (Burgoyne y Morgan, 2003), las CCs han sido usadas como un modelo para estudiar la correlación entre el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis (Neher, 1998).

Para 1968 Douglas caracterizó la excitabilidad y los potenciales de acción en las CCs durante los cuales se activan canales de calcio de la membrana plasmática y producen la entrada de Ca^{2+} , el resultado es una elevación del Ca^{2+} citosólico, mecanismo que induce la exocitosis (Penner y Neher, 1988; Bley y Tsien, 1990; Scholz y Miller, 1991; Cox y Dunlap, 1992; Pollo et al., 1992; Boland y Bean, 1993; Cheek TR y Barry 1993; Livett, 1993; Amico et al., 1995; Fox y Currie, 1996; Aunis, 1998; Dolphin, 2003).

3.1 *Modulación de los Canales de Calcio*

En todos los tipos de células, el ion calcio es un importante segundo mensajero, sin embargo se sabe que una alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede ser tóxica para cualquier célula, es por eso que el Ca^{2+} intracelular debe mantenerse en niveles bajos (Somlyo y Somlyo, 1994; Ghosh y Greenberg, 1995). En reposo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es mantenida en aproximadamente 100 nM, lo cual representa 10^8 de la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre extracelular aproximadamente 1 mM. Por todo esto Borle y colaboradores (en 1981 y 1987) predijeron que existían varios mecanismos eficaces para mantener el gradiente electroquímico del Ca^{2+} . Además encontraron que la mayor parte de calcio que entra a la célula es por los CCDV, los cuales también se modulan por variaciones en las concentraciones locales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Dunlap y Fischbach en 1981 fueron los primeros en reportar que la aplicación exógena de distintos tipos de neurotransmisores disminuye la conductancia al Ca^{2+} , así como Marchetti y colaboradores (1986) observaron por primera vez en cultivo de neuronas sensoriales de pollo, que algunos neurotransmisores regulan la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ dependiente de voltaje. Observaron que cada célula expresa diferentes tipos de receptores y que su activación por distintos neurotransmisores desencadena múltiples vías de señalización intracelular modulando la función de un canal de diversas formas, afectando principalmente la dependencia de voltaje, la velocidad y la probabilidad de apertura (Hille, 1992; García y Carbone, 1996; Carbone y García, 1996; Dolphin, 1996).

Bean en 1989, describió que la inhibición en canales de Ca^{2+} inducida por neurotransmisores, inducen cambios en su dependientes de voltaje y velocidad de activación provocado disminución en la corriente de $\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$, ya que al modificar alguna de estas fases, una proporción de los canales adquiere una cinética de apertura mucho más lenta y necesitarán de una despolarización más grande para abrir. A este fenómeno se le denominó inhibición dependiente de voltaje.

3.2 Inhibición de los canales de Ca^{2+} por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)

Holz y colaboradores así como Dolphin y Scott en 1986 demostraron que la $\text{I}_{\text{Ca}^{2+}}$ puede ser inhibida en muchos tipos de células por estimulación de GPCRs (G proteins coupled to receptors) subtipos G_i y G_o sensibles a toxina pertussis (PTX). En neuronas, Marchetti en 1986 mostró que este mecanismo es limitado a membrana por interacción canal-proteína G (Dolphin y Scott, 1987; Hescheler et al., 1987; Ikeda, 1991; Lewis et al., 1986; Wanke et al., 1987; Hille, 1994). Evidencias recientes de Herlitze y colaboradores, 1996 y Dolphin, 1997, muestran que este acople tiene un papel importante en la retroalimentación negativa (inhibición) de los CCDVs.

Catterall en el 2000 describe que mediante la activación de proteínas G acopladas a canales de Ca^{2+} se produce una disminución de la corriente, dependiente del estado entre el complejo canal-proteína G, que unido cambia la cinética de apertura del canal. Dolphin demuestra que estas son vías sin mensajeros solubles intracelulares por lo tanto sus efectos son reversibles por una fuerte despolarización que promueve el desacople canal-proteína G (Dolphin 1995, Hille 1994, Wickmand y Clepham, 1995).

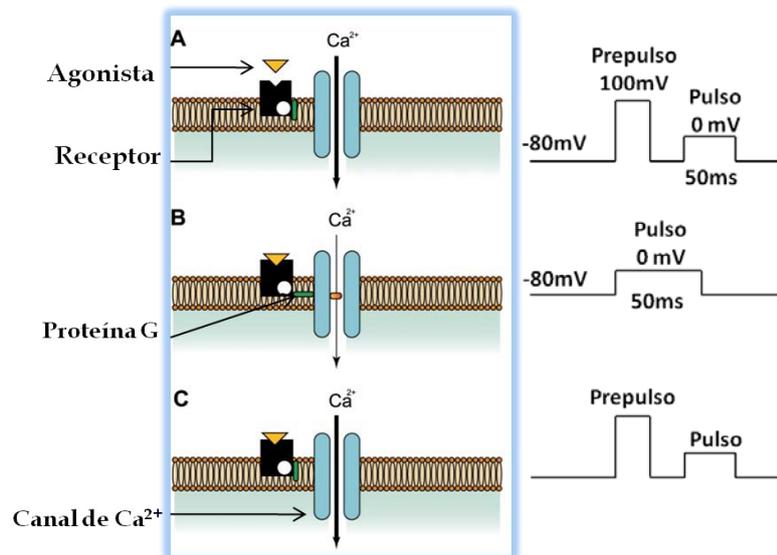


FIG. 6. **A**, En ausencia del agonista del receptor las GPCRs no promueven cambios en la $I_{Ca^{2+}}$ a través de los canales de Ca^{2+} . **B**, La activación de las GPCRs por el agonista del receptor, promueve el acople de las proteínas G a el canal de Ca^{2+} induciendo un enlentecimiento en su activación y por lo tanto la $I_{Ca^{2+}}$ disminuye. **C**, La inhibición de algunos canales de Ca^{2+} es voltaje dependiente por lo tanto, la aplicación de un fuerte prepulso despolarizante provoca el desacople de la proteína G del canal y la $I_{Ca^{2+}}$ es recuperada (facilitation). (Modificado de: García, 2006).

Los efectos de las proteínas G han modelado satisfactoriamente el cambio entre los dos estados de un canal de Ca^{2+} , el dependiente de voltaje y el dependiente de ligando (Catterall, 2000), dependiente o independiente de voltaje respectivamente. Esto ha sido descrito por Fox y Currie, ya que los canales de calcio exhiben dos estados funcionales de apertura, uno en presencia "reluctant, no disponible" y otro en ausencia de un modulador inhibidor "willing, disponible".

Dolphin en 1996 estudió que los efectos de la subunidad $\beta\gamma$ de las proteínas G pueden estar ejerciendo inhibición en los canales de Ca^{2+} por uno o más sitios (estado independiente de voltaje) (Dolphin, 2003). La inhibición de los canales de Ca^{2+} afecta su dependencia de voltaje (como se ya se menciona), este efecto es revertido mediante una fuerte despolarización que da como resultado la disminución de los canales inhibidos por proteínas G, que se conoce como: facilitación de la $I_{Ca^{2+}}$ dependiente de voltaje, donde los canales no disponibles cambian su estado a disponibles para abrir aproximadamente durante 100 ms regresando después a la condición de no disponible (Bean, 1989; Marchetti et al., 1986; Catterall, 2000). Indicando que la facilitación por despolarización involucra disociación de las proteínas G del canal y reinhibición por repolarización involucra reasociación (Fig. 6) (Hille, 1997; Kasai, 1992; Kuo y Bean, 1993).

3.3 *Expresión heterogénea de la modulación inhibitoria en canales HVA*

Deisz y Lux en 1985 demostraron el efecto de la modulación inhibitoria en canales de calcio HVA pero no en LVA. Para los años 90's con el manejo de técnicas moleculares se evidenció que las subunidades intracelulares β de los CCDV ($\text{Ca}\beta$) tienen marcados efectos en las propiedades de canales de calcio HVA $\alpha 1$ (familias Ca_v1 y Ca_v2) que incluyen el flujo de iones de Ca^{2+} a través de los canales de calcio, la modificación de la cinética de la corriente y propiedades dependientes de voltaje (Singer et al., 1991; De Waard et al., 1994; Chien et al., 1995; Brice et al., 1997; Bichet et al., 2000).

La mayoría de los trabajos descritos hasta ahora se enfocan en la subfamilia Ca_v2 de los canales de calcio HVA, ya que son los que muestran la clásica modulación por proteínas G, comprenden a la subunidad $\text{Ca}_v2.1$ (Tipo P/Q) (Mori et al., 1991; Swartz, 1993), $\text{Ca}_v2.2$ (Tipo N) (Dubel et al., 1992; Luebke y Dunlap, 1994) y $\text{Ca}_v2.3$ (Tipo R) (Soong et al., 1993). Trabajos recientes en células neurosecretoras han mostrado que los canales tipo L ($\text{Ca}_v 1$) también participan en este tipo de modulación (Albillos et al., 1996; Pollo et al., 1993). Esto provocó controversia entre resultados de Albillos y colaboradores en 1994 con los de Aron Fox y colaboradores (Artalejo et al., 1994; 1992) debido a que ambos grupos observaron variaciones en los mecanismos de modulación por liberación endógena entre los canales L y los no-L dentro de la clasificación HVA en CCs de bovino. El grupo de Aaron Fox demostró que los canales L son modulados por mecanismos dependientes de voltaje (la facilitación se observa relacionada a los canales L); contrario a estos resultados, Albillos y colaboradores encontraron que la modulación en canales L esta dada por mecanismos independientes de voltaje (no están asociados a la facilitación).

Resultados mas actuales apuntan a que los canales tipo N y P/Q de CCs son inhibidos por neurotransmisores de un modo dependiente de voltaje (Aicardi et al., 1991, Albillos et al., 1994; Hernández-Guijo et al. 1998, 1999; Carabelli et al. 2001). Pero la regulación dependiente de voltaje también toma lugar en los canales tipo L (Gandía et al., 1993; Pollo et al., 1993; Albillos et al., 1996; Carabelli et al., 1998; Hernández-Guijo et al., 1999; Cesetti et al., 2003).

Recientemente en el laboratorio del Dr. Arturo Hernández se demostró que la I_{Ca}^{2+} de CCs registradas en condiciones cercanas a las fisiológicas preservando su medio ambiente tisular (rebanadas de glándula adrenal de ratón) tienen dos mecanismos que regulan diferencialmente la inhibición de la I_{Ca}^{2+} por ATP y Metionina-encefalina, el independiente de

voltaje que involucra a los canales L y la modulación dependiente de voltaje de los canales tipo N- y P/Q (no-L) (Hernández A. et. al., 2009)

3.4 *Inhibición de los CCDVs por neurotransmisores autoliberados*

Winkler y Westhead publicaron en 1980 que los gránulos secretorios de las CCs además de catecolaminas, almacenan ATP (150 mM) y opioides como Leucina y metionina-enkefalina (2 mM), los cuales son co-liberados con las catecolaminas (Castillo et al., 1992). Experimentos de Diverse-Pierluissi y colaboradores en 1991 y Gandia y colaboradores en 1993 reportaron que la aplicación exógena de ATP retrasa y disminuye la activación de la amplitud de la I_{Ca}^{2+} en CC, estos efectos son mediados por receptores purinérgicos P_{2y} acoplados a proteínas G, (Currie y Fox, 1996) (Fig. 6). Mas tarde Albillos y colaboradores (1996) demostraron que efectos similares ocurren en presencia de opioides a través de la activación de receptores μ y δ opioidérgicos igualmente tienen una acción moduladora sobre canales de calcio de las CCs, provocando una lenta activación del canal y un decremento en la amplitud de la corriente vía proteínas G (Fig. 6).

Para finales de los 90's se reconoció que la inhibición de los CCDVs por proteínas G en CCs, requiere de la activación de receptores purinérgicos P_{2y} , μ y δ opioidérgicos y α_2 y β_2 -adrenérgicos por la liberación endógena de ATP y opioides, disminuyendo de este modo la amplitud de la corriente (Kleppisch, 1992; Gandia, 1993; Albillos et al., 1996; 1996; Carabelli et al., 1998; 2001; Hernandez-Guijo et al., 1999; Carbone et al., 2001).

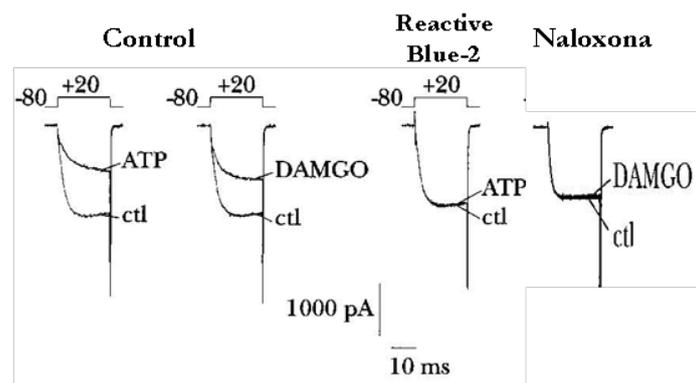


FIG.6. Registros de I_{Ca}^{2+} de CCs de bovino en cultivo donde se observa la inhibición inducida por aplicación ATP y DAMGO (agonistas de receptores purinérgicos y opioidérgicos, respectivamente) y se demuestra que Reactive blue-2 un antagonista de receptores P_{2y} purinérgicos y naloxona, antagonista de receptores μ y δ opioidérgicos revierten la inhibición inducida por ATP y DAMGO (Modificado de Currie y Fox, 1996).

Fox y Currie (1996) propusieron que probablemente la inhibición de los CCDV por la liberación de neurotransmisores endógenos representa un mecanismo en el cual los neurotransmisores liberados de las células actúan autócrina y/o parácrinamente.

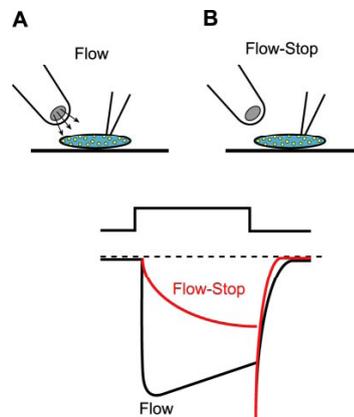


FIG.7. Representación de la metodología empleada para el estudio de la regulación de la $I_{Ca^{2+}}$ por liberación endógena de neurotransmisores. **A**, Perfusión rápida. **B**, Condición de parada de flujo que permite la acumulación de productos de secreción promoviendo la inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ por la unión de los productos de secreción con sus receptores.

3.5 Experimentos con parada de de flujo (modulación Autocrina)

El primer experimento donde se demostró que los neurotransmisores liberados por la célula incrementaran su concentración alrededor de la célula y se unieran a sus receptores fue hecho por Kirpekar y Puig en 1971, este consiste en provocar una detención del flujo de la solución que baña a la célula que está siendo registrada (Fig. 7). En esas condiciones de registro la liberación de neurotransmisores endógenos en CCs es inducida por el Ca^{2+} que entra a la célula durante la estimulación por aplicación de pulsos despolarizantes.

En otros estudios, Doupnik y Pun (1994), Albillos y colaboradores (1996), Currie y Fox (1996) mostraron evidencias indirectas de la modulación autócrina al describir que el rango de activación y la amplitud de $I_{Ba^{2+}}$ en CCs de bovino dependen de las condiciones experimentales de perfusión. La actividad celular en un medio sin perfusión favorece la elevación local de productos de secreción ATP y opioides co-liberados en conjunto con catecolaminas, los cuales quedan confinados en el espacio extracelular, subsecuentemente activan GPCRs induciendo la inhibición de canales de Ca^{2+} , dicha inhibición puede ser revertida por un pulso despolarizante de mayor magnitud (“facilitación”) y la inhibición tónica de la corriente también puede ser restablecida reanudando la perfusión sobre la superficie celular retirando el material liberado (fig. 8).

3.6 Liberación endógena de neurotransmisores modula la $I_{Ca^{2+}}$ en CCs

La hipótesis de la modulación autócrina de los canales de Ca^{2+} fue comprobada por experimentos de Albillos y colaboradores en 1996, en donde se mostró que el ATP y las encefalinas que modulan canales de Ca^{2+} están almacenadas con catecolaminas en altas concentraciones en las vesículas (Winkler et al., 1987), por lo tanto, los contenidos de un lisado vesicular (*soluble vesicle lysate*, SVL) aplicado exógenamente en la superficie de una CC disminuye la corriente HVA de una manera dependiente de la concentración y del voltaje. El resultado de la aplicación de SVL fue la disminución de la $I_{Ca^{2+}}$ y la recuperación por facilitación (fig. 8).

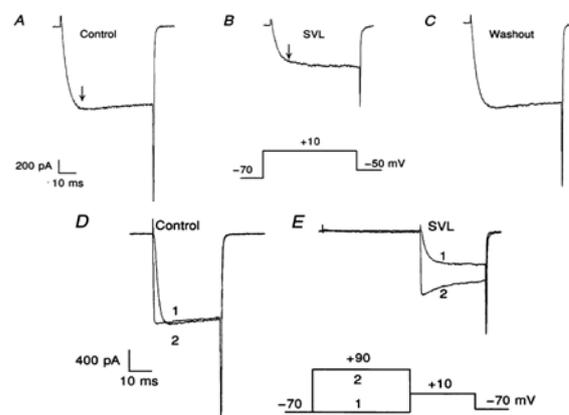


FIG. 8. Efectos de la SVL en $I_{Ba^{2+}}$ en fijación de voltaje en CCs, donde se demuestra que los productos almacenados en las vesículas cromafines inhiben la $I_{Ca^{2+}}$ de un modo voltaje dependiente (Albillos et al., 1996).

3.7 Modulación de los canales de Ca^{2+} en células agrupadas

Una maniobra basada en experimentos en células agrupadas simulando una situación *in situ* se llevó a cabo por Callewaert, Johnson y Morad en 1991 que estimuló CCs de bovino para observar secreción. Fue retomada más tarde por Kajiwara y colaboradores (1997) para mostrar que la disposición de las CCs en rebanada de glándula adrenal les permite ser simultáneamente excitadas debido a que tienen una inervación común, la cual se conserva en dicha preparación.

En 1998, trabajos de Hernandez-Guijo y colaboradores así como de Gandía y colaboradores, lograron mediante esta técnica mostrar la modulación autócrina/parácrina de la $I_{Ca^{2+}}$ de CCs de bovino y humano, comparando una situación de célula individual versus célula inmersa en un cúmulo bajo condiciones de cultivo. Encontrando que la modulación por estimulación de la exocitosis en células agrupadas es más pronunciada (enlentecimiento de la activación de la corriente, disminución de la amplitud y recuperación de la $I_{Ca^{2+}}$ por prepulso),

a diferencia de lo que encontraron en una célula aislada en la cual ninguna de estas características es afectada (Fig. 9).

Además de la modulación, en estos trabajos también fue estudiado el efecto de Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} o Na^+ , iones con carga que se transporta a través de los CCDV. Estas condiciones crean diferentes rangos de exocitosis, por lo tanto causan diferentes grados de modulación de los canales de Ca^{+2} dependiendo de la cantidad de neurotransmisores liberados (máxima cuando usaron Ba^{2+}).

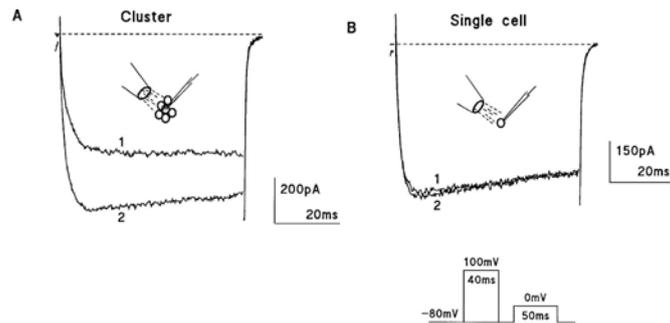


FIG. 9. Figura que demuestra la presencia de una modulación dependiente de voltaje de una CCs inmersa en un grupo (A) y en una CCs aislada (B) por la comparación de los trazos sobrepuestos de la $I_{\text{Ba}^{2+}}$, después de la aplicación de un pre-pulso despolarizante (Hernandez-Guijo et al., 1998).

Las células agrupadas son más similares al tejido adrenomedular intacto que una célula aislada, así mismo, debido a que el material secretado de células vecinas puede tener implicaciones en la modulación, en las propiedades eléctricas y actividad secretora, el empleo de rebanadas de glándula adrenal podrían proporcionar un amplio entendimiento de mecanismos de modulación autócrina y parácrina en CCs en una situación más parecida a la fisiológica y los resultados pueden extrapolarse a lo que ocurre en el organismo cuando se lleva a cabo una liberación de los productos de secreción de CCs (Garcia, 2006).

4. Justificación

La modulación de CCDVs HVA por neurotransmisores, ha sido sujeto de numerosos estudios en cultivos de neuronas y CCs, debido a la importancia que dicha regulación para prevenir la liberación descontrolada de catecolaminas que puede ser letal en una crisis de hipertensión, arritmias o en situaciones de estrés, entre otros. Sin embargo, existen escasos estudios relacionados con CCs en tejido intacto, su medio ambiente natural o formando agregados manteniendo interacciones entre la célula en registro con las células vecinas.

Existen reportes de que el procedimiento de disociación para aislar células que involucran tratamiento mecánico, enzimático y el tiempo de incubación, puede tener algún efecto directo o indirecto sobre la expresión y regulación de las proteínas de membrana como receptores y/o canales, los cuales son tema de estudio en este trabajo. Por otra parte, el arreglo anatómico que se conserva en la rebanada de glándula adrenal puede tener implicaciones importantes como en las corrientes iónicas y moléculas de señales difusibles que pueden ser intercambiadas entre células *via gap junctions* (Martin et al., 2001). Además la ACh y otras sustancias liberadas de las terminales nerviosas y los mismos productos de secreción de CCs probablemente se mantengan presentes en el espacio extracelular (Barbara et al., 1998).

Actualmente en el laboratorio del Dr. Hernández Cruz, con tejido adrenal intacto se demostró, que en CCs en rebanada de glándula adrenal de ratón prevalece una inhibición basal de $I_{Ca^{2+}}$ mediada por receptores purinérgicos y opioidérgicos. Esta inhibición mantenida de $I_{Ca^{2+}}$ puede ser fisiológicamente relevante para la regulación de señales de Ca^{2+} y exocitosis, la cual es considerablemente distinto en rebanada adrenal comparada con las células aisladas en cultivo. Con base en estos antecedentes y debido a que no existen trabajos donde se aborde el estudio de modulación de los CCDVs en un contexto más cercano a su situación fisiológica, el presente estudio está enfocado en evaluar la modulación autócrina y parácrina de la $I_{Ca^{2+}}$ por neurotransmisores aplicados exógenamente y co-liberados de forma endógena con catecolaminas en CCs de rebanada de glándula adrenal de rata, donde el medio ambiente celular está preservado y gran parte de las interacciones entre las células son conservadas.

5. Hipótesis

- Si se promueve la acumulación de neurotransmisores endógenos (ATP y opiodes) de la célula en registro y de las células vecinas, estos se unirán con mayor probabilidad a sus receptores y disminuirán la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$, recuperándola después por la aplicación de un pre-pulso despolarizante.
- Si la liberación endógena de ATP disminuye la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ por activación de receptores purinérgicos P_{2y} , entonces la aplicación exógena de ATP disminuirá del mismo modo la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$, esto podrá revertirse por un pre-pulso e impedir el efecto sobre el receptor usando Suramina, un antagonista de receptores purinérgicos.
- Si la liberación endógena de encefalinas disminuye la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ a través de la activación de receptores μ y δ opioidérgicos, entonces la aplicación exógena de Leucina-encefalina disminuirá la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ y esto podrá ser revertido por pre-pulso e impedir el efecto sobre el receptor usando Naloxona, un antagonista de receptores opioidérgicos.

6. Objetivo General

Caracterizar la modulación autócrina y parácrina de la I_{Ca}^{2+} por ATP y opioides, endógenos y exógenos en células cromafines de rebanada de glándula adrenal de rata.

6.1 *Objetivos Particulares*

- Cuantificar la modulación dependiente e independiente de voltaje de la I_{Ca}^{2+} por los productos endógenos liberados de la célula registrada así como de células vecinas por acumulación de estos productos en el medio extracelular, deteniendo el flujo de la perfusión.
- Evaluar la modulación de la I_{Ca}^{2+} por aplicación exógena de ATP y/o leucina-encefalina.
- Demostrar que la modulación de la I_{Ca}^{2+} sucede por la activación específica de los receptores purinérgicos y opioidérgicos utilizando sus antagonistas selectivos, Suramina y Naloxona respectivamente.
- Explorar la dependencia de voltaje de la modulación de la I_{Ca}^{2+} por ATP y Leucina-encefalina.

7. Materiales y Métodos

Los animales utilizados en este trabajo fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde fueron mantenidos de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

7.1 *Obtención de rebanadas de Médula adrenal*

Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 semanas de edad. Los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (0.1 ml/250 g), se sacrificaron por decapitación e inmediatamente ambas glándulas adrenales fueron removidas y embebidas en solución externa *A* a 8° C (ver tabla de soluciones). A las glándulas se les retiró el exceso de grasa; se preparó agar al 3 % diluido en solución externa *A* a 100° C, una vez que alcanzó 35° C las glándulas fueron embebidas dentro del agar. El agar se solidificó en refrigeración con el tejido adrenal incorporado. Los bloques de agar fueron recortados en cubos de aprox. 5 mm, se posicionaron y fijaron a un soporte móvil de un vibratomo (Vibratome 3000). Para la obtención de las rebanadas se llenó el soporte con solución externa *A* a punto de congelación.

Las glándulas se seccionaron en rebanadas de 200 micrometros de grosor que rápidamente se colectaron y se mantuvieron en solución externa *A* a 25° C, permitiendo la estabilización al menos media hora antes del registro, el cual se realizó durante un lapso de hasta 8 horas después de la preparación de las rebanadas.

7.2 *Soluciones*

Las soluciones externas *A* y *B* empleadas fueron mantenidas en burbujeo continuo con una mezcla de 95 % O₂/ CO₂ 5 %, el pH se mantuvo a 7.35 - 7.4 utilizando bicarbonato de sodio, la composición de la solución externa varió de acuerdo a las condiciones del experimento.

Durante la formación del sello de alta resistencia entre la pipeta de registro y la célula, la preparación fue perfundida con solución *A*. Una vez que se logró la configuración de célula completa se cambió la perfusión de la preparación con la solución extracelular *B* que contenía 10 mM CaCl₂ (como transportador de carga). La velocidad del flujo de la perfusión fue de 1.5 ml/ min, regulado por gravedad (controlado por un sistema de válvulas BPS/4), consiguiendo el recambio de la solución en la cámara de registro en 20 s. Para aislar la I_{Ca}²⁺, todos los experimentos se llevaron a cabo en presencia de 1 μM de TTX para bloquear corrientes de

Na⁺. En la solución interna se utilizó TEA y CsCl₂ para bloquear corrientes de K⁺. En la tabla 3 se muestra la composición de las soluciones empleadas.

Tabla 3 de soluciones

A		B			
Externa		Externa		Interna	
NaCl	125.0		126.0	NaCl	10.0
KCl ₂	2.0		3.5	CsCl	100.0
MgCl ₂	1.0		0.5	TEACl	20.0
NaHCO ₃	26.0		26.0	Mg ²⁺ ATP	2.0
NaH ₂ PO ₄	1.25		0.0	Na ⁺ GTP	0.3
Glucosa	10.0		10.0	EGTA	14.0
CaCl ₂	2.0		10.0	HEPES	10.0
TTX	0.0		0.001		

En mM (**A, B e interna**).

Para la solución a y b se preparó una solución madre sin CaCl₂ y bicarbonato de sodio, ambos compuestos fueron adicionados el día del experimento.

Los fármacos utilizados fueron diluidos a partir de una solución madre en la solución externa de registro **B** hasta obtener la concentración requerida. Todos los fármacos y reactivos empleados fueron adquiridos de SIGMA-Aldrich.

7.3 *Registro de la corriente y adquisición de datos*

Previamente al registro, las rebanadas se colocaron en una cámara de perfusión instalada en un microscopio vertical (Optiphot 2-UD Nikon, Tokyo, Japan); que tiene adaptada una videocámara Hitachi KP/160U la cual proyecta la imagen a un monitor SONY PVM-135. El sistema de registro electrofisiológico está compuesto de un electrodo de plata clorurado conectado al cabezal de un amplificador EPC-10 (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany). Las pipetas de registro se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato de diámetro externo de 1.2 mm y diámetro interno de 0.69 mm (Warner Instrument Corp., Hamden, Connecticut, EUA), mediante un estirador de vidrio o “puller” modelo P-97 (Sutter Instruments Co., EUA) con una resistencia cuando estaban llenas de solución intracelular de 4 - 6 MΩ.

Las corrientes de calcio se registraron usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración *whole cell* (célula completa) de acuerdo con los procedimientos estándar de Fenwick y colaboradores, 1982 y Hamill y colaboradores en 1981, para estudiar las

propiedades de las células excitables (CCs) con el registro de alta resolución de corrientes a través de canales iónicos por medio de *voltage-clamp* (fijación de voltaje).

La pipeta de registro se acercaba a la célula usando un micromanipulador Burleigh P3/301, una vez que la pipeta de se encontraba en la superficie de la célula se aplicó una ligera presión negativa (succión). El contacto con la célula era detectado por un cambio repentino en la resistencia de la pipeta de registro, mientras la pipeta presionaba a la célula se formaba un sello de alta resistencia estable por arriba de $1\text{ G}\Omega$ (configuración “on-cell”) esta configuración forma transientes de corriente capacitiva debido a la pipeta de registro que fueron compensados electrónicamente. Después se fijó el potencial de membrana en -80 mV (valor de mantenimiento negativo con respecto al potencial del baño). En seguida se aplicó una succión adicional que rompiera la membrana celular atrapada en la pipeta de registro. En esta configuración, aparece la corriente capacitiva de la membrana celular. La capacitancia típica de la membrana en CCs de rata tiene un rango de 5 a 13 pF, consistente con el diámetro de las células de 9 a 20 μM , se cancelaban los transientes capacitivos y se compensaba la resistencia en series automáticamente con el programa Patchmaster (HEKA Elektronik), en el cual también, se controlaba la adquisición de los datos, los cuales fueron adquiridos a 5 kHz y los datos fueron almacenados en el disco duro de una computadora y analizados con la aplicación “online análisis” del programa patchmaster. Todos los experimentos fueron realizados en un cuarto con una temperatura de $(22\text{-}24^\circ\text{ C})$.

La activación de las I_{Ca}^{2+} fue provocada por pulsos despolarizantes a 0 mV con una duración de 50 ms. Para esto se realizó previamente una curva de relación IV (Corriente-Voltaje) para medir el voltaje donde se obtiene la amplitud máxima de la I_{Ca}^{2+} , con base en este resultado se aplicaron los pulsos de prueba despolarizantes. La modulación de la I_{Ca}^{2+} se evaluó mediante la aplicación de pre-pulsos despolarizantes a $+80\text{ mV}$, los cuales precedían a los pulsos de prueba para promover el desacople de los CCDV y las proteínas G, de este modo se evaluó la modulación dependiente de voltaje de la I_{Ca}^{2+} .

Las rebanadas fueron perfundidas continuamente con solución extracelular **B**, mientras se aplicaba el protocolo experimental arriba mencionado para determinar la modulación en condición “Control” de las I_{Ca}^{2+} , después el flujo fue detenido para provocar la acumulación de neurotransmisores endógenos liberados de células vecinas así como de la célula registrada e inducir la modulación autócrina y parácrina, a continuación se inicio un lavado restaurando el flujo continuo para eliminar dichas sustancias.

Para determinar la modulación de la $I_{Ca^{2+}}$ por activación directa de receptores purinérgicos y/o opioidérgicos, se realizó un protocolo para la aplicación de fármacos, en donde posteriormente a la medición en la condición control, se agregó ATP (100 μ M) y/o Leucina-encefalina (10 μ M) exógenamente sin detener la perfusión, seguida del lavado con solución externa **B**. Para bloquear los efectos de ATP y/o leucina-encefalina se adicionó Suramina a 200 μ M (antagonista de receptores purinérgicos) y Naloxona a 10 μ M (antagonista de receptores opioidérgicos).

7.4 Análisis estadístico

Durante los cursos temporales, la corriente macroscópica de Ca^{2+} se evaluó midiendo la amplitud de la corriente a los 10 ms después del comienzo del pulso despolarizante a 0 mV debido a que es ahí donde se alcanzó la corriente de activación máxima. Los datos se extrajeron del programa Patchmaster, se organizaron y almacenaron en Excel. De la misma forma se obtuvieron los datos del protocolo de pre-pulso. Se midió la amplitud máxima de las corrientes obtenidas con el pulso despolarizante control; sin prepulso y con pre-pulso, a continuación, se llevó a cabo la normalización de los datos tomando siempre el control como el 100 % y el porcentaje de los datos del registro con la aplicación del fármaco o tratamiento dependió únicamente de su registro control.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa Graph Pad Prisma 5.0. Las diferencias significativas de dos grupos experimentales eran evaluadas utilizando la prueba de análisis de varianza de una vía (“One-way ANOVA”) con un nivel de significancia de $p < 0.05$. A continuación al obtener el análisis, se extrajeron y diseñaron las figuras mediante los trazos representativos de los registros, para esto se utilizó el programa Origin 6.0 (OriginLab Corp., North Hampton, Massachusetts, EUA) y Power Point, los cuales se ilustran en la sección de resultados.

8. Resultados

Aislamiento de la $I_{Ca^{2+}}$ en CCs en rebanadas de glándula adrenal de rata.

Las CCs de médula adrenal fueron registradas con la técnica de “patch clamp” en la configuración “whole-cell”. La $I_{Ca^{2+}}$ se aisló del resto de las corrientes bloqueando la I_{Na^+} con TTX y suprimiendo la I_K^+ con TEA y CICs. Para determinar el voltaje en el que se alcanza la mayor amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ se construyó una relación corriente voltaje (curva I/V), para esto la $I_{Ca^{2+}}$ se activó por pulsos cuadrados despolarizantes de 50 ms de duración aplicados cada 10 s en escalones de voltaje de 10 mV de -60 a +60 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Como resultado con 10 mM de Ca^{2+} , la $I_{Ca^{2+}}$ se activó a -40 mV, encontrando el pico máximo alrededor de 0 mV y mostrando un aparente potencial de reversión a +50mV. Después de obtener esto, la amplitud máxima de la $I_{Ca^{2+}}$ se activó aplicando pulsos cuadrados a 0 mV con 50 ms de duración, manteniéndose constante durante 10 min sin señales de rundown. Los trazos típicos de la $I_{Ca^{2+}}$ inducidos por un pulso prueba durante 50 ms a 0 mV se muestran en la Fig. 9.

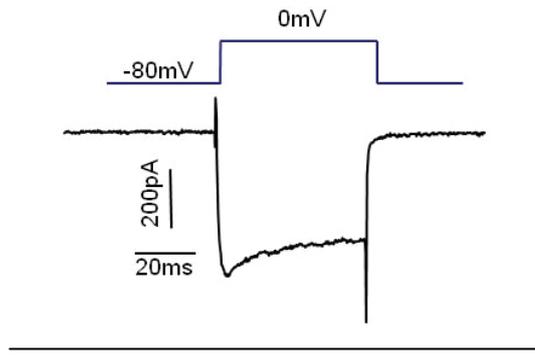


Fig. 9. Trazo representativo de la corriente de calcio obtenido a 0 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. El promedio de la amplitud de la corriente fue de 602 ± 22 pA en 10 mM Ca^{2+} (n= 92).

8.1 La parada de flujo modula la $I_{Ca^{2+}}$ de una manera autócrina/parácrina por neurotransmisores endógenos liberados.

La entrada de Ca^{2+} en respuesta a la estimulación o la actividad eléctrica espontánea puede inducir la liberación endógena de neurotransmisores, los cuales pueden actuar en receptores presentes en la membrana de la célula que está siendo registrada induciendo la modulación de los CCDV.

La propuesta experimental para facilitar la unión de los neurotransmisores a sus receptores, consiste en detener el flujo de la solución extracelular que baña la preparación, de esta manera la concentración local de neurotransmisores liberados endógenamente podría incrementar y aumentar la probabilidad de unirse a sus receptores presentes en las CCs

(Kirpekar y Puig 1971). Para evaluar la modulación dependiente de voltaje en condición control (en baño continuo y sin la presencia de ningún fármaco), se aplicó un pre-pulso despolarizante a +80 mV, el cual precedía a un pulso de prueba, obteniéndose una recuperación de la $I_{Ca^{2+}}$ dependiente de voltaje, con un promedio de 7% (n=85), como se observa en el trazo representativo de la Fig. 10. Esto indica que existe una inhibición tónica de los CCDV en el tejido adrenal intacto, que puede deberse a la liberación espontánea de neurotransmisores.

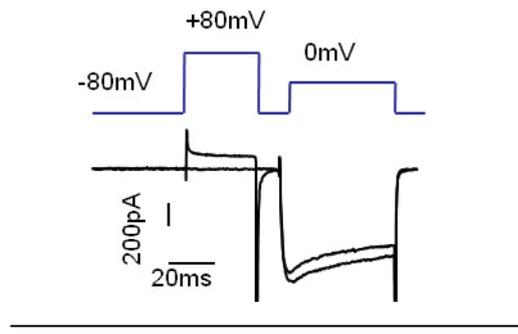


Fig. 10. Trazo Promedio de la $I_{Ca^{2+}}$ superpuesto, antes y después del registro por un pre-pulso a +80 mV indicando la corriente dependiente de voltaje recuperada $7 \pm 0.5 \%$ de la total (n= 85).

Lo anterior sucede cuando la solución extracelular fluye sin permitir acumulación de productos de secreción liberados, pero al detener el flujo del baño se favoreció la concentración local de productos de secreción ATP y opioides, los cuales quedan confinados en el espacio extracelular (Doupnik y Pun, 1994; Albillos et. al., 1996; Currie y Fox, 1996). Para examinar si la acumulación de neurotransmisores liberados durante la parada de flujo tiene efecto en la $I_{Ca^{2+}}$ se monitoreó mediante un curso temporal de pulsos despolarizantes cada 10 s, durante 150 s aproximadamente el efecto de detener el flujo sobre la $I_{Ca^{2+}}$. Las figuras 11A a la 11C muestran el curso temporal de trazos de la amplitud de corriente durante la parada del flujo, esto causó disminución de la $I_{Ca^{2+}}$ con un rango de aproximadamente 8% - 28% con respecto a la tónica promediando $17 \pm 2 \%$ n=17, de 503 ± 39 a 422 ± 37 pA, $p < 0.05$. Este efecto fue reversible en la mayoría de las células (435 ± 83 pA). El efecto dependiente de voltaje sobre la $I_{Ca^{2+}}$ promovido por la parada de flujo se evaluó mediante la aplicación de un pre-pulso despolarizante previo al pulso control; mediante este protocolo se recuperó entre el 8% - 26% de la amplitud de la corriente inhibida, con una promedio de $14 \pm 1 \%$ (n= 19), lo cual equivale a 84% de la corriente disminuida total. Algunas células tuvieron poco o ningún efecto de recuperación de la corriente durante parada de flujo (4 de 20 células). Los resultados indican que neurotransmisores acumulados por la parada de flujo disminuyen la $I_{Ca^{2+}}$ y además una gran parte de la disminución puede ser recuperada por voltaje.

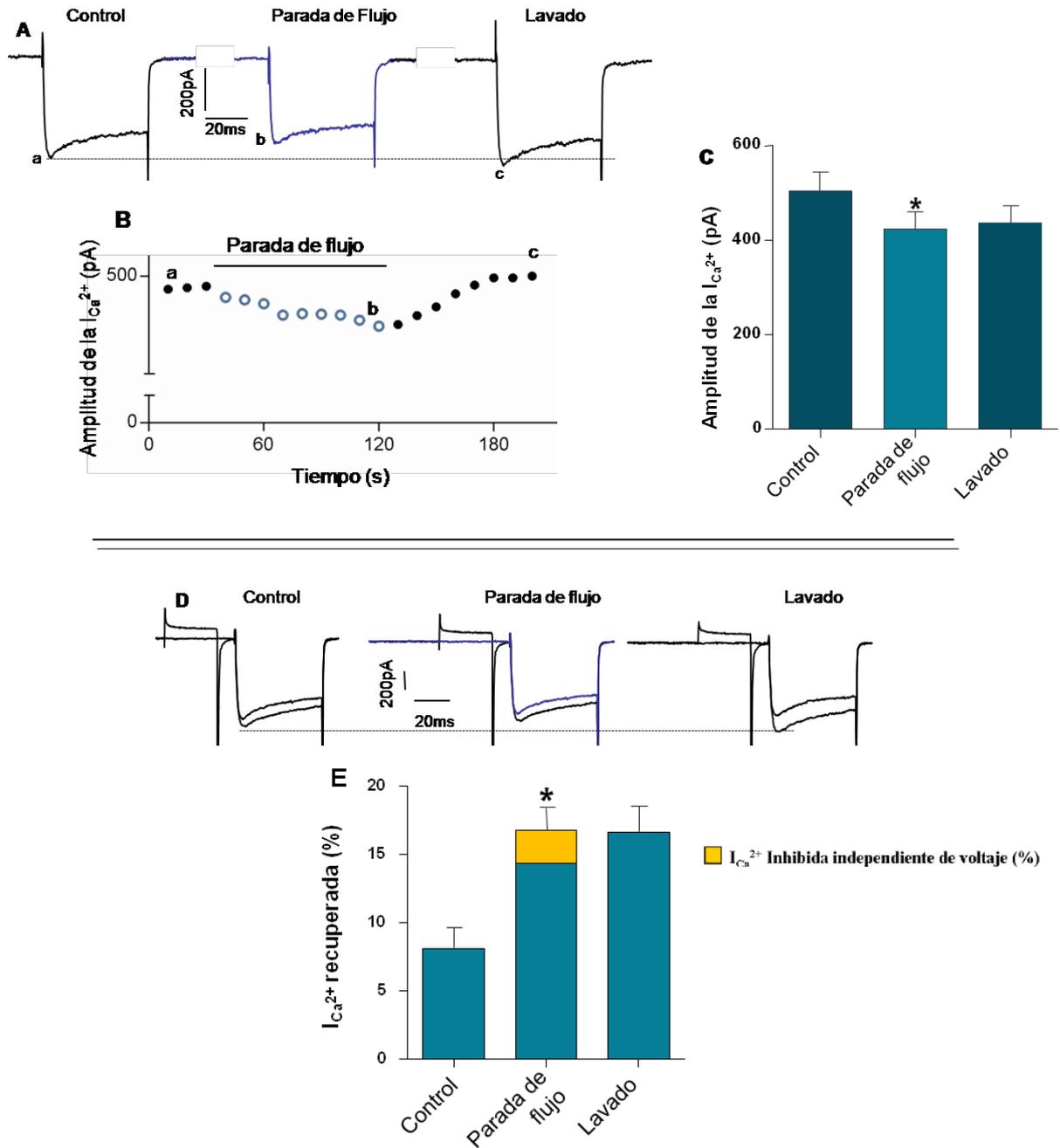
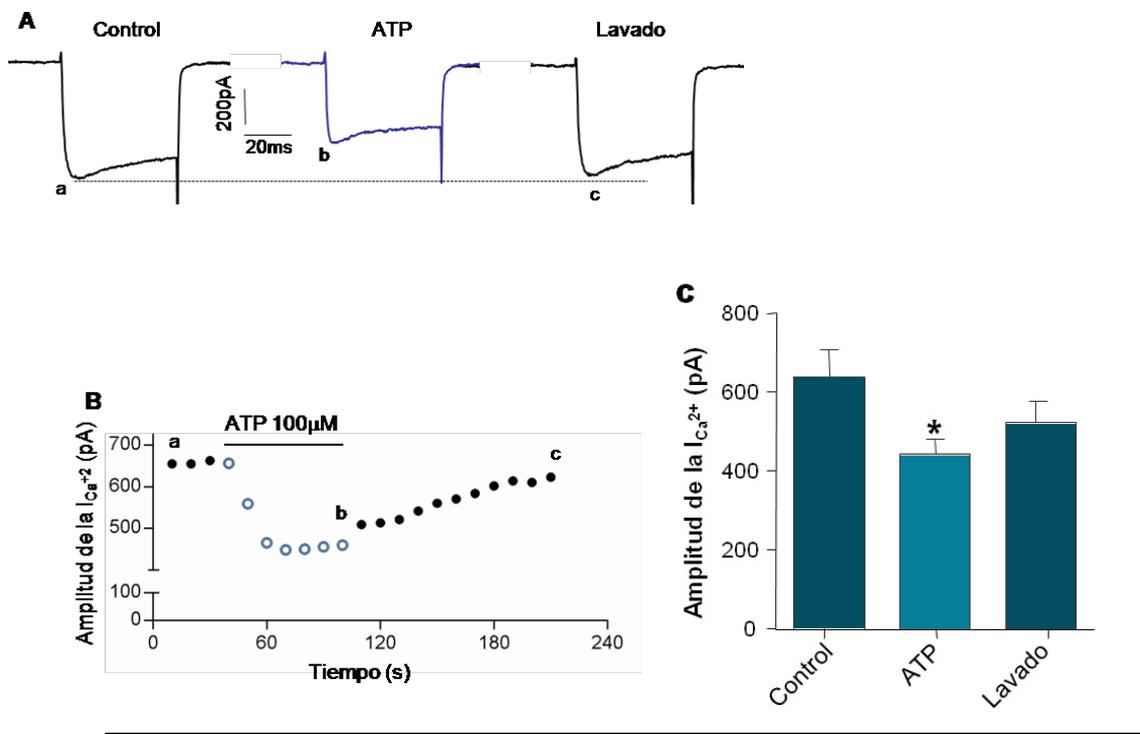


Fig. 11 A: Trazos de la $I_{Ca^{2+}}$ inducidos por pulsos despolarizantes a 0 mV. Cuando el flujo del baño fue detenido, la $I_{Ca^{2+}}$ decreció (trazo azul). **B:** Curso temporal de la disminución de la $I_{Ca^{2+}}$ por parada de flujo. **C:** Resumen de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ bajo las diferentes condiciones experimentales. ($n=17$, $p<0.05$) **D:** Trazo de la $I_{Ca^{2+}}$ superpuesto, antes y después del registro por un pre-pulso a +80 mV indicando la modulación dependiente voltaje. Durante la parada de flujo incrementó la modulación comparada con la condición en flujo constante y el registro observado después del lavado. **E:** Resumen del porcentaje de corriente recuperada por pre-pulso. La $I_{Ca^{2+}}$ modulada en condición de flujo constante (control) fue incrementando de 7 a 14 % en la condición parada de flujo ($n= 20$). La $I_{Ca^{2+}}$ inhibida en total fue 16 ± 1 %, en azul la corriente recuperada por voltaje y en amarillo la corriente inhibida independiente de voltaje.

8.2 Activación de los receptores purinérgicos por ATP disminuyen la $I_{Ca^{2+}}$.

En las CCs se conoce el contenido de ATP en sus gránulos secretorios (Winkler y Westhead, 1980), también se sabe que el ATP endógeno disminuye la $I_{Ca^{2+}}$ en estas células (Gandía et al., 1993), por lo tanto en este trabajo se examinó el efecto de la aplicación de ATP exógenamente para compararlo con la disminución de la $I_{Ca^{2+}}$ observada por la parada de flujo. Durante el curso temporal se observó que al adicionar ATP (100 μ M) sobre la célula, se redujo la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ después de los primeros 10 s pasando de 638 ± 68 pA a 442 ± 37 pA, $p < 0.05$), el efecto fue reversible entre los 50 a 60 s después del lavado de ATP del baño (Fig. 12A a 12C). En todas las células la $I_{Ca^{2+}}$ disminuyó en respuesta a la aplicación de ATP, el porcentaje promedio fue de 28 ± 2 % ($n = 25$, $p < 0.05$). Mostrando que el ATP aplicado exógenamente disminuye la $I_{Ca^{2+}}$ en mayor proporción que la que producen los neurotransmisores endógenos. El ATP disminuye la $I_{Ca^{2+}}$ de forma dependiente de voltaje, ya que está puede ser completamente revertida por un pre-pulso despolarizante con una media de 26 ± 1 % ($n = 28$, $p < 0.05$), recuperando el 95 % de la disminución total (Fig. 12D y 12E). Durante el lavado la modulación dependiente de voltaje regresó completamente al estado basal.



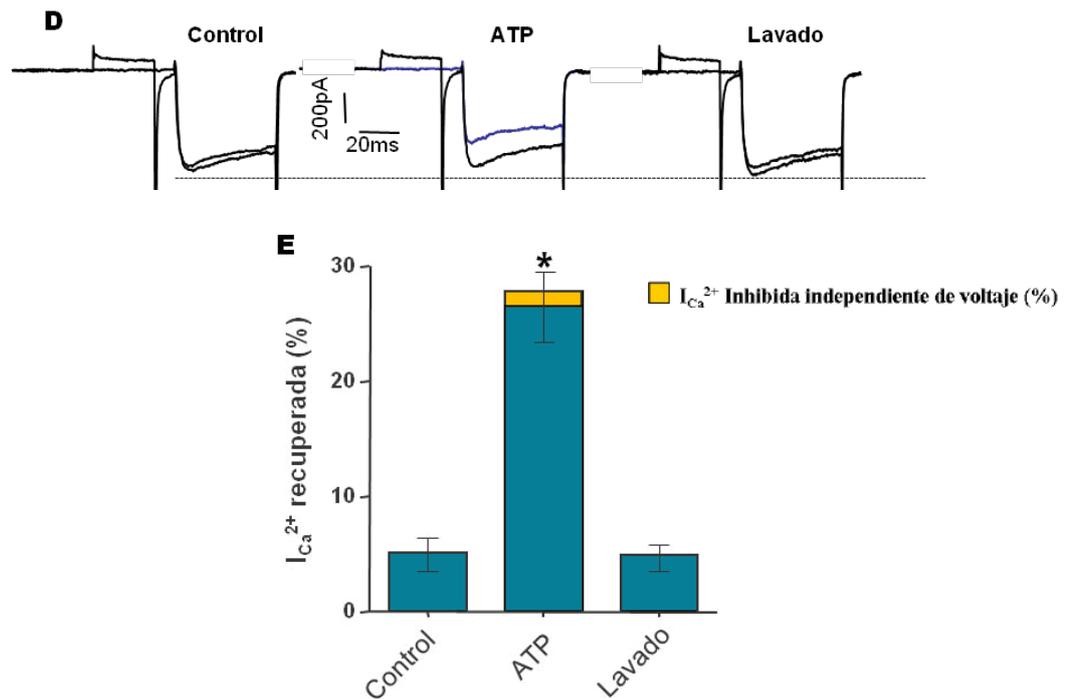


Fig. 12 A: La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ decrece después de la adición de ATP (100 μ M) en el baño. **B:** Curso temporal de la $I_{Ca^{2+}}$ después de la adición de ATP. **C:** Resumen del porcentaje disminución de la corriente. **D:** Trazos sobrepuestos de la $I_{Ca^{2+}}$ control y después de la aplicación del pre-pulso, indican la modulación dependiente de voltaje. **E:** Porcentaje de $I_{Ca^{2+}}$ recuperada por la aplicación de pre-pulso incrementando de 5 en condición control a 23 % en presencia de ATP, $n=28$. En amarillo, la $I_{Ca^{2+}}$ inhibida dependiente de voltaje 1.28 %.

8.3 Activación de los receptores opioidérgicos por Leucina-encefalina disminuyen la $I_{Ca^{2+}}$

La activación de los receptores opioidérgicos por sus agonistas, Met-enc, Leu-enc, DAMGO, disminuyen la $I_{Ca^{2+}}$ en CCs en cultivo (Albillos et al., 1996; 1996; Carabelli et al., 1998; 2001; Gandia, 1993; Kleppisch, 1992; Hernandez-Guijo et al., 1999). Bajo esta circunstancia cuando [Tyr¹-Gly²-Gly³-Phe⁴-Leu⁵]-encefalina (Leu-enc, 10 μ M) fue agregada durante la perfusión, la mayoría de las células registradas (19 de 20) mostraron una disminución en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ (Fig. 14A y 14C) de 18 ± 1 % pasando de 646 ± 44 a 524 ± 38 pA, $p < 0.05$ después de los primeros 10 s. Cuando el pulso de prueba era precedido por un pre-pulso despolarizante, se observó una pequeña recuperación de la $I_{Ca^{2+}}$ dependiente de voltaje del 16 ± 1 % ($n=20$, $p < 0.05$) con un rango de 8 a 34 % (Fig. 13D y 13E), lo cual corresponde a 84 % de la disminución total. El efecto fue parcialmente revertido entre los 50 a 60 s del lavado de Leu-enc. El efecto de Leu-enc mostró algunas características semejantes a la inhibición que inducen los elementos endógenos.

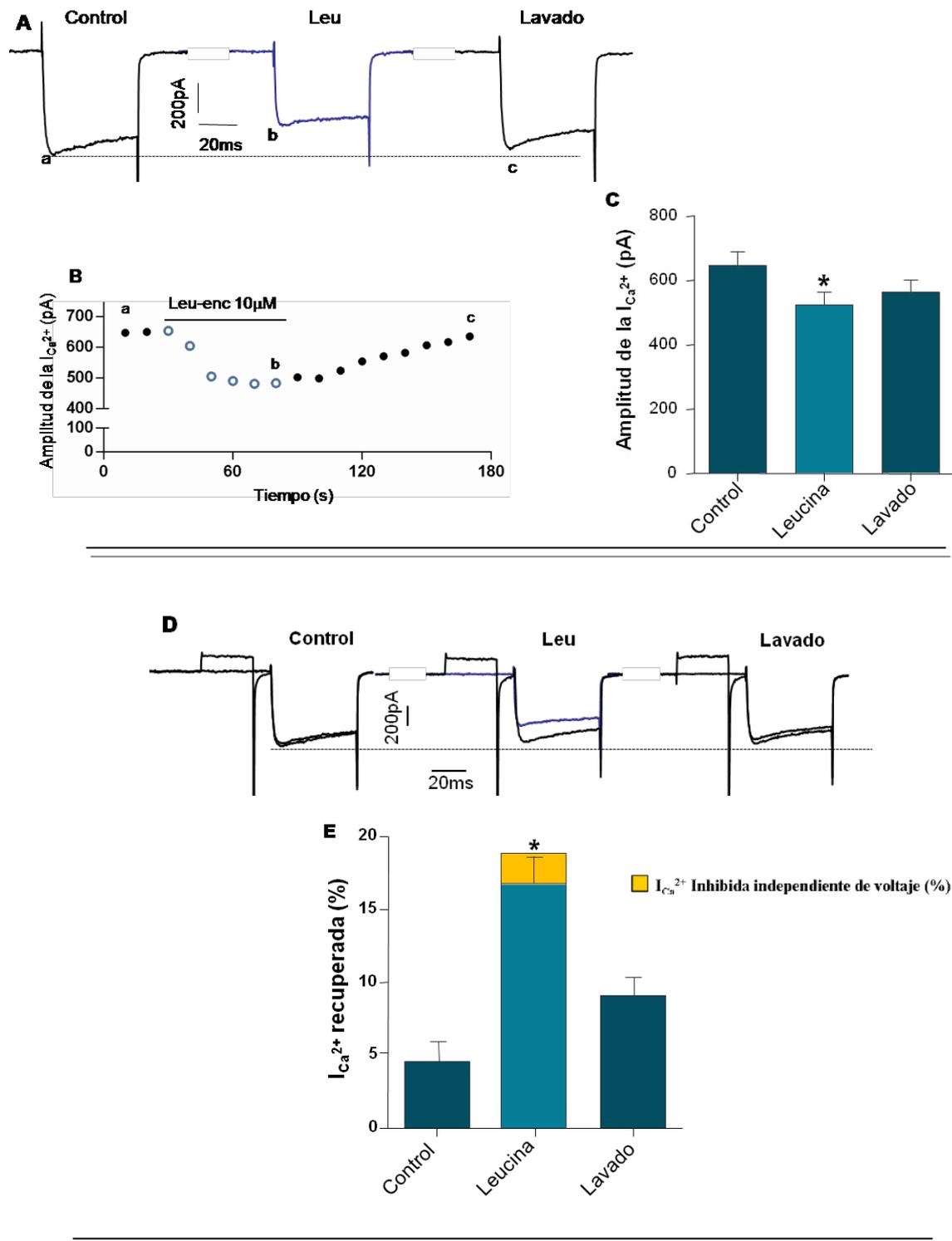
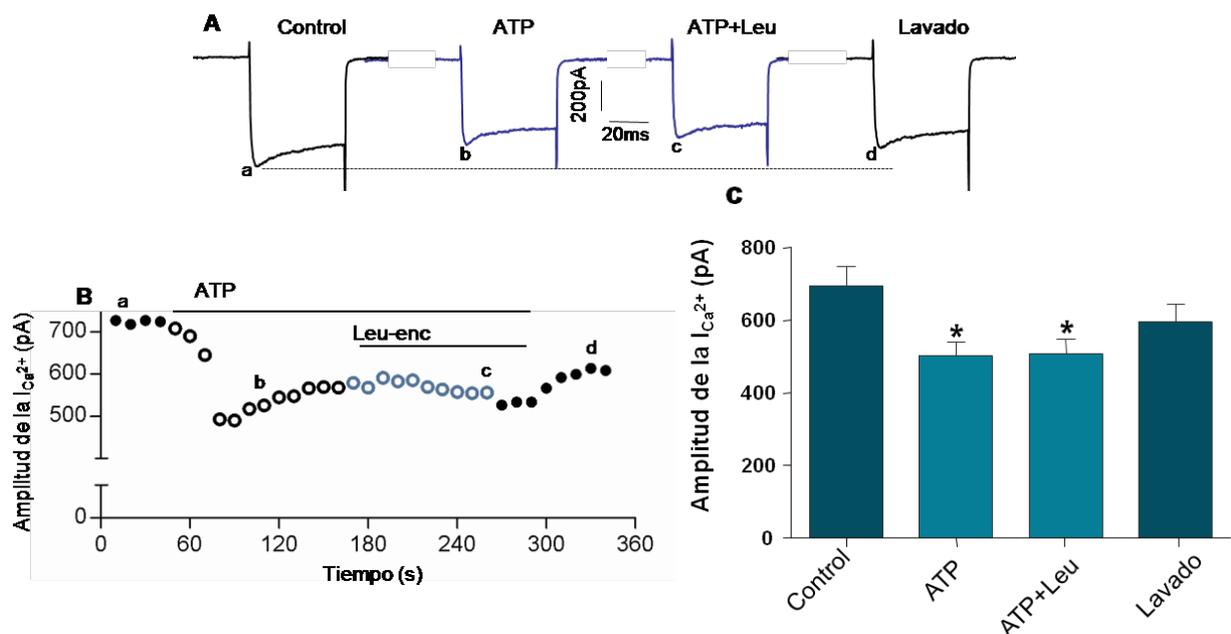


Fig. 13 A: La amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ decrece por aplicación exógena de Leu-enc (10 μ M) en el baño. **B:** Curso temporal de la disminución de la $I_{Ca^{2+}}$ por aplicación de Leu-enc. **C:** Resumen del porcentaje disminución de la corriente. **D:** registros sobrepuestos de la corriente control y después de la aplicación de pre-pulso que indica la modulación dependiente de voltaje. **E:** Porcentaje de corriente recuperada por prepulso de 5 en control a 16 % en presencia de Leu-enc. La corriente recuperada fue menor que con la aplicación de ATP. $n = 20$. En amarillo, la $I_{Ca^{2+}}$ inhibida dependiente de voltaje de 2.11 %.

8.4 Modulación de la $I_{Ca^{2+}}$ por ATP y Leu-enc

Los efectos del ATP más Leu-enc puede causar grandes alteraciones en la entrada de Ca^{2+} a la célula (García, 2006). Estos efectos pueden constituir las bases de una regulación coordinada en la liberación de catecolaminas a la circulación durante situaciones de estrés, por lo tanto se decidió explorar la modulación de la $I_{Ca^{2+}}$ por aplicación exógena de ambos neurotransmisores, ATP y opiodes en CCs in situ. En las Figuras 14A-C se ilustra un ejemplo del curso temporal de la $I_{Ca^{2+}}$ en una célula que exhibió modulación por ATP más Leu-enc, la amplitud de la corriente durante la perfusión con ATP 100 μ M se reduce 26 % de la amplitud de la corriente (control 695 ± 53 a 502 ± 37 pA con ATP; $p < 0.05$; $n = 15$) la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$; al combinar con el agonista de receptores μ - y δ -opioideérgicos, Leu-enc (10 μ M), el resultado en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ no muestra una disminución adicional (26 ± 2 %), se observó que la amplitud de la corriente alcanza un estado de disminución estable con ATP 502 ± 37 a 507 ± 39 pA con ATP más Leu-enc. Estos efectos ocurren en todos los casos y no fueron totalmente revertidos por el lavado de los agonistas de dichos receptores.

En presencia de ATP o ATP mas Leu-enc, cuando los pulsos de prueba eran precedidos por un prepulso despolarizante a +80 mV, se observó una facilitación dependiente de voltaje de la $I_{Ca^{2+}}$ de modo similar en ambas situaciones 26 ± 2 % en presencia de ATP y 24 ± 2 % en presencia de ATP más Leu-enc (Fig. 14D y 14E), sugiriendo que la modulación por ATP y/o Leu-enc no es aditiva y por lo tanto pueden estar funcionando por la misma vía de señalización.



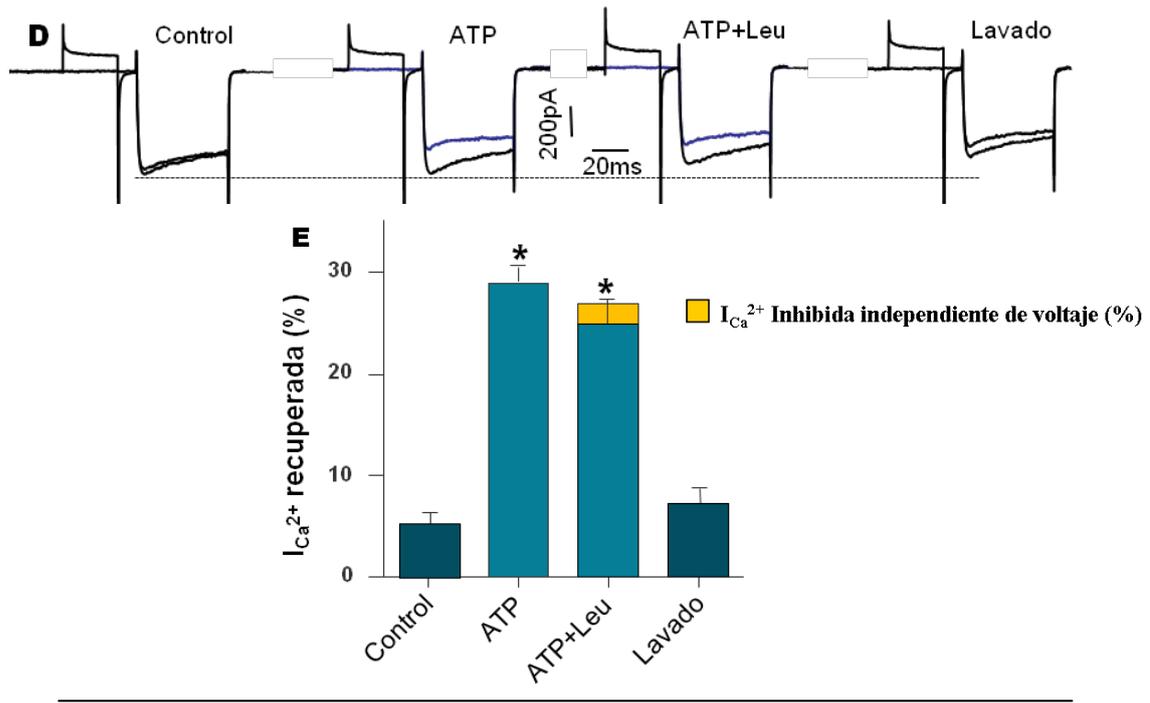


Fig. 15 A: La disminución de la $I_{Ca^{2+}}$ por adición de ATP (100 μ M) y ATP+ Leu-enc (10 μ M) en el baño **B:** Curso temporal de la disminución de la $I_{Ca^{2+}}$ por la adición de ATP y ATP + Leu-enc. Los efectos de leu-enc no fueron adicionales sobre los del ATP. **C:** Corriente promedio disminuida por aplicación exógena de ATP y ATP +Leu-enc. **D:** Registros sobrepuestos de corrientes control y los recuperados por la aplicación de pre-pulso indicando la modulación dependiente de voltaje en presencia de ATP y Leu-enc. **E:** Porcentaje de la corriente recuperada por la aplicación de pre-pulso en la presencia de ATP y ATP +Leu-enc. Los efectos no fueron aditivos (n= 15).

8.5 Bloqueo de los receptores P_{2Y} purinérgicos y μ - y δ -opioidérgicos evitan la modulación de la $I_{Ca^{2+}}$

La inhibición tónica en los canales de Ca^{2+} puede ser explicada por la acumulación y adición de ATP y Leu-enc, actuando sobre receptores específicos de la membrana acoplados a proteínas G que interactúan con CCDVs. Para identificar si la inhibición en la $I_{Ca^{2+}}$ es producida por los receptores purinérgicos y opioidérgicos, se aplicó suramina (100 μ M) y naloxona (10 μ M), antagonistas de recetores purinérgicos y opioidérgicos que evitan la unión de ATP y leu-enc a sus receptores y por lo tanto deberían prevenir la reducción de la $I_{Ca^{2+}}$. La Figura 16A^b ilustra el efecto en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ por ATP más Leu-enc, una disminución de 27 ± 2 % n=6. La adición simultanea de los antagonistas suramina y naloxona recupera parte de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ disminuida (15 ± 4 %, de 385 ± 66 a 437 ± 65 pA, $p < 0.05$). El curso temporal (Fig. 16B) muestra la desinhibición máxima de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por el bloqueo de los receptores P_{2Y} , μ - y δ -opioidérgicos por suramina y naloxona respectivamente, y este efecto se alcanzó después de dos minutos de perfusión. La facilitación de la $I_{Ca^{2+}}$ revelada por el pre-pulso despolarizante bajo aplicación de ATP y Leu-enc durante el registro (30 ± 5 % n=7, Fig.

16D y 16E) no es completamente revertida por la aplicación de suramina y naloxona ($12 \pm 3 \%$, $p < 0.05$), estos resultados apoyan la idea de que en CCs *in situ*, la $I_{Ca^{2+}}$ es inhibida a través de receptores purinérgicos y opioidérgicos de manera dependiente de voltaje.

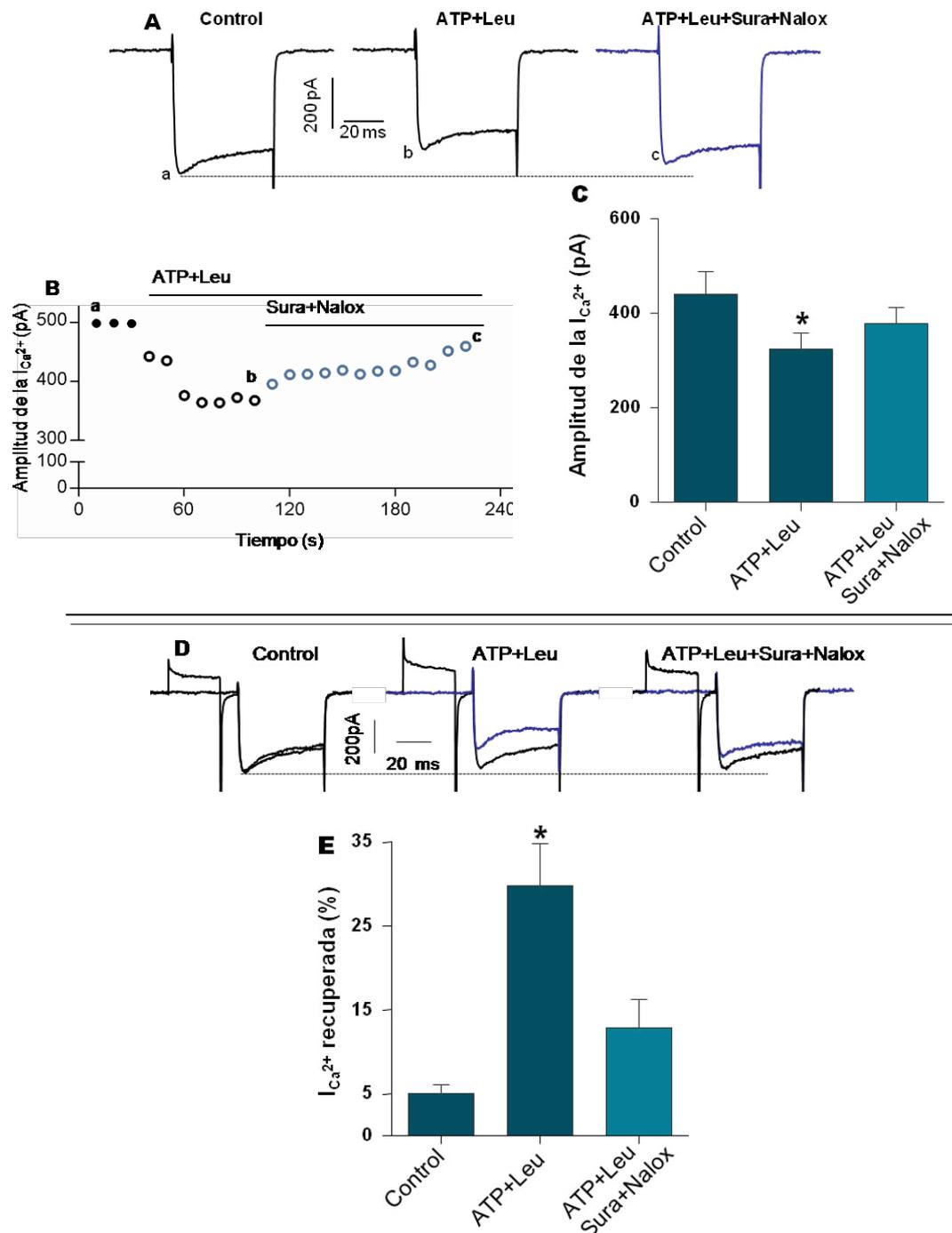
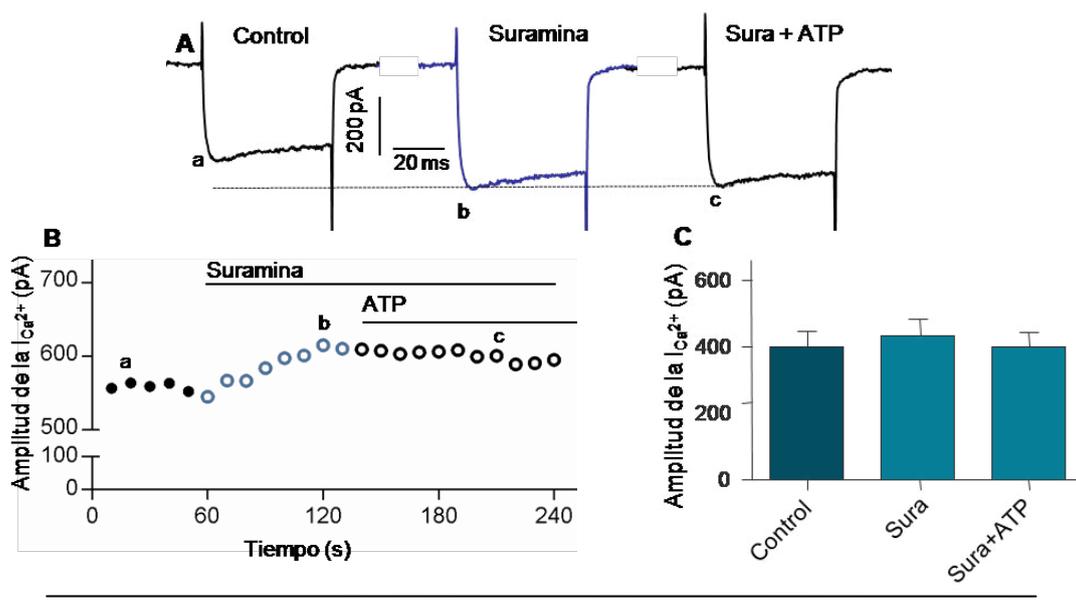


Fig. 15 A: Trazos representativos del efecto de ATP, Leu-enc, suramina y naloxona en la $I_{Ca^{2+}}$. **B:** Curso temporal de la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ durante la adición de ATP, Leu-enc, suramina y naloxona. **C:** Promedio de la amplitud máxima de la corriente y el efecto de ATP, Leu-enc, suramina y naloxona. **D:** Registros sobrepuestos de la corriente control y la recuperada por la aplicación de pre-pulso indicando la modulación dependiente de voltaje en presencia de ATP, Leu-enc, suramina y naloxona. **E:** Porcentaje de la corriente recuperada por la aplicación de pre-pulso despolarizante. ($n = 7$).

Al aplicar suramina (200 μM) en el baño, la amplitud de la corriente durante el curso temporal de pulsos, induce una recuperación de la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ (potenciación) independiente de voltaje inhibida en un $10 \pm 2 \%$ (control 399 ± 48 a 435 ± 49 pA con suramina; $p < 0.05$; $n = 9$) la cual se eliminó al añadir a la perfusión ATP 100 μM a 399 ± 44 pA (Figs. 16A a 16C).

El pre-pulso para recuperar la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ dependiente de voltaje en presencia de suramina, mostró una recuperación de la corriente de Ca^{2+} equivalente a la recuperada en condiciones tónicas ($8 \pm 1 \%$ $n = 10$), sin embargo se observó que al aplicar ATP con suramina, la corriente recuperó con el pre-pulso despolarizante $19 \pm 2 \%$ (Fig. 16D y 16E), lo cual puede indicar que el efecto del ATP sobre la corriente dependiente de voltaje no es totalmente evitado por su antagonista. Además, este resultado apoya a lo observado por Hernández A. y colaboradores en el 2009, donde se sugiere que los receptores purinérgicos están regulando la $I_{\text{Ca}^{2+}}$ por dos mecanismos separados, el primero dependiente de voltaje y el segundo independiente de voltaje en el cual se observa una porción importante de la inhibición de la $I_{\text{Ca}^{2+}}$.



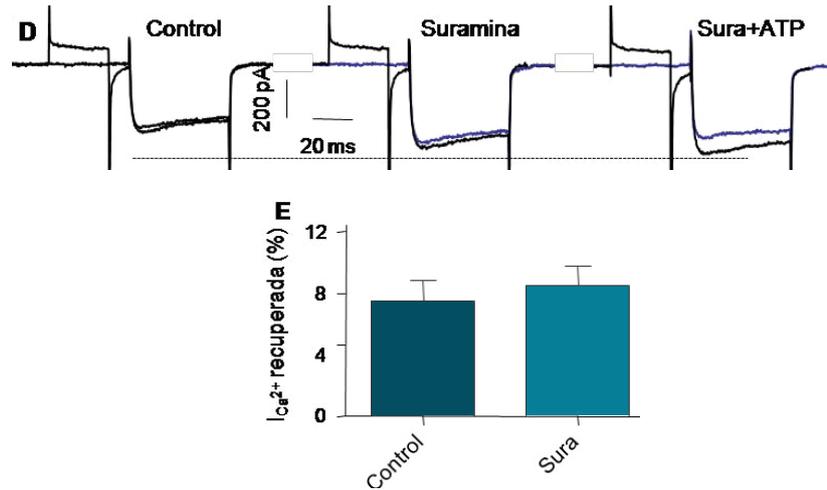


Fig. 16 A: Trazos representativos del efecto de suramina en la $I_{Ca^{2+}}$ en presencia y ausencia de ATP **B:** Curso temporal de la $I_{Ca^{2+}}$ durante la adición de suramina y ATP. **C:** Promedio de las amplitudes de la corriente por efecto de Suramina y ATP. **D:** Registros sobrepuestos de la corriente control y la recuperada por la aplicación de pre-pulso indicando la modulación dependiente de voltaje en presencia de suramina y ATP. **E:** Porcentaje de la corriente recuperada por la aplicación de pre-pulso. (n= 10).

La naloxona es un antagonista selectivo de los receptores μ - and δ -opioidérgicos, no tiene acción directa en la $I_{Ca^{2+}}$ (sin potenciación) la cual muestra amplitudes de 342 ± 25 y 341 ± 25 pA (n=5) en ausencia y presencia de naloxona $10 \mu\text{M}$, respectivamente (Fig. 17A y 17B). La modulación media inducida por Leu-enc $10 \mu\text{M}$ en presencia de naloxona fue de 0 % (342 ± 22 pA). De la misma forma al recuperar la $I_{Ca^{2+}}$ dependiente de voltaje con el pre-pulso despolarizante, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos, la media de la corriente recuperada en ausencia y presencia de naloxona fue 7 % y 8 ± 1 % (n=9) respectivamente, así mismo con Leu-enc en presencia de naloxona fue de 8 % (Fig. 17C), con estos datos se observó que la presencia de naloxona bloquea totalmente los efectos de Leu-enc sobre los receptores opioidérgicos y que la inhibición dependiente e independiente de voltaje no muestra ningún efecto en presencia de naloxona, lo cual predice que estos receptores posiblemente no estén involucrados en la regulación tónica de la $I_{Ca^{2+}}$.

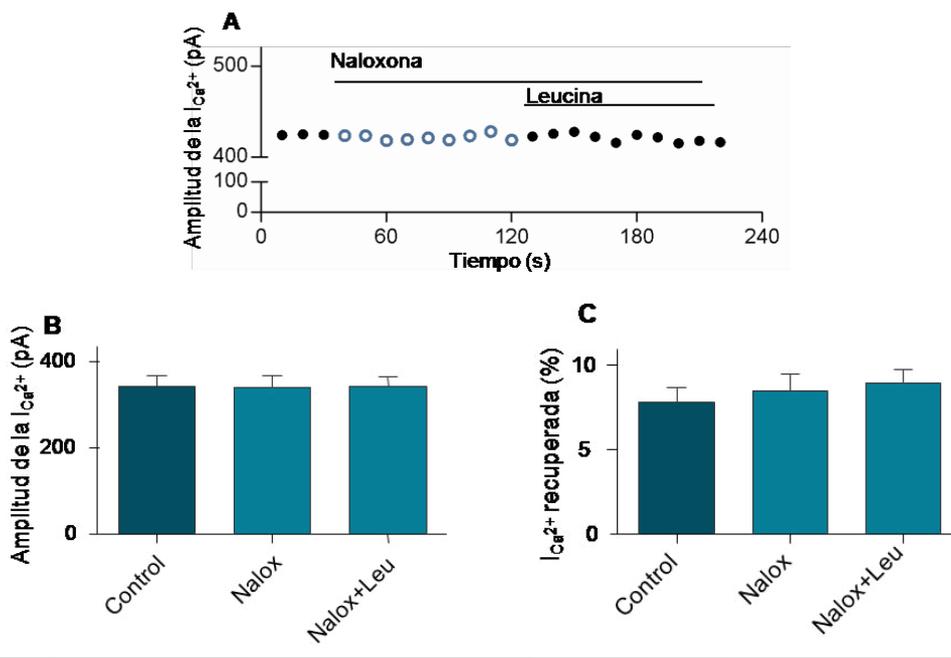


Fig. 17 A: Curso temporal de la $I_{Ca^{2+}}$ durante el efecto de naloxona y Leu-enc. **B:** Promedio de las amplitudes de la corriente control y el efecto de naloxona y Leu-enc. **C:** Porcentaje de la corriente recuperada por la aplicación de pre-pulso indicando la modulación dependiente de voltaje en presencia de naloxona y Leu-enc. (n= 9).

8.6 Efecto de ATP y Leu-enc en la $I_{Ca^{2+}}$ Dependiente de voltaje

Para poder evaluar si el efecto de ATP o Leu-enc sobre la $I_{Ca^{2+}}$ depende del voltaje se construyeron curvas I/V a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV, con pulsos de voltaje despolarizante, aplicados en intervalos de 10 s cada 5 mV incrementados de -60 a +50 mV y los datos de corriente fueron normalizados entre la capacitancia de la célula mostrándose como densidad de corriente (pA/pF). Como resultado todas las curvas I/V mostraron una activación de la corriente entre -40 y -45 mV, la corriente al pico en condición control fue de 71 ± 5 pA/pF (n=6) y un potencial de reversión en aproximadamente +50 mV. Las células se registraron bajo condiciones control y posteriormente bajo los efectos de ATP (Fig. 18A) o Leu-enc (Fig. 18B); el pico máximo inducido por ATP se observó en -5 mV con una disminución en la densidad de corriente de 71 ± 5 a 55 ± 3 pA/pF ($p < 0.05$), principalmente entre el rango de voltajes donde se encuentra el pico máximo, mostrando en la fig. 18A los valores de activación y reversión sin diferencias del control. En presencia de Leu-enc se observó una disminución en la densidad de corriente de 62 ± 5 a 55 ± 5 pA/pF ($p < 0.05$), en la fig. 18B se observa poca o ninguna disminución en potenciales negativos, es a partir de los -20 mV en donde comienza la disminución en la misma magnitud hasta +40 mV donde se encontró su potencial de reversión.

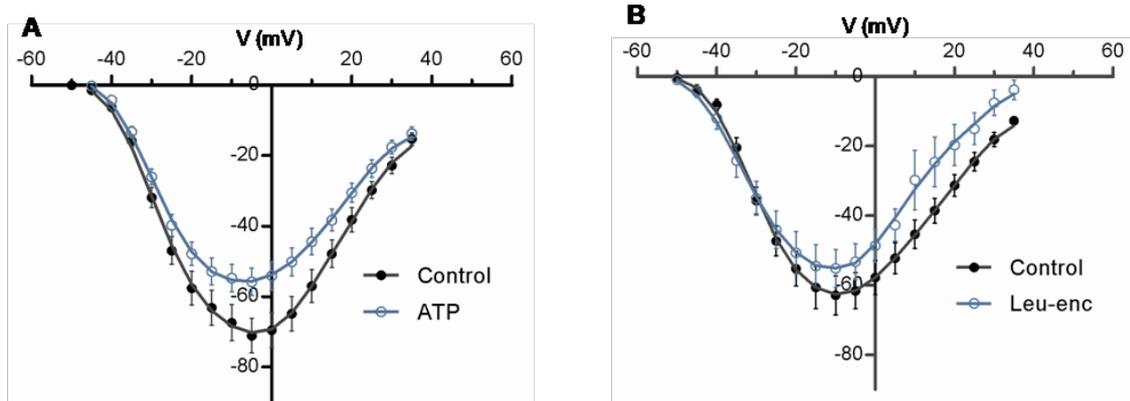


Fig. 18. Relación corriente voltaje de registros en CCs bajo condiciones control (trazo en negro) **A.** Con ATP se produjo la disminución de la corriente. **B.** Durante la perfusión con Leu-enc, la disminución se observó en voltajes más positivos comenzando en -20 mV, modificando el potencial de reversión a 40 mV.n=6.

9. Discusión

La idea central de este estudio fue investigar la modulación de la $I_{Ca^{2+}}$ por neurotransmisores en CCs de la glándula adrenal en una preparación que asemeje más su ambiente natural, como lo es la rebanada de tejido adrenal.

Esta modulación se relaciona con la liberación de neurotransmisores endógenos por actividad eléctrica espontánea y/o estimulada de dichas células, durante la cual los incrementos en la concentración de calcio intracelular promueve la liberación de catecolaminas, ATP, encefalinas, entre otros, de esta manera los neurotransmisores secretados pueden actuar autócrina y/o paracrinamente al unirse a sus receptores que están acoplados a proteínas G, las cuales interactúan con los CCDVs. En este contexto, se piensa que las células agrupadas tienen una mayor interacción para responder coordinadamente ante una condición de estrés.

De las múltiples funciones del Ca^{2+} como segundo mensajero, una de las más importantes es inducir la liberación de hormonas y neurotransmisores, debido a que el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ regula los procesos exocitóticos como sucede en las CCs, células neuroendocrinas y neuronas (García et al., 2006; Neher y Sakaba, 2008). Se sabe que diversos tipos de neurotransmisores regulan la $I_{Ca^{2+}}$, como lo reportaron por primera vez Dunlap y Fischbach (1978). Después, Marchetti y colaboradores (1986) demostraron que diversos tipos de neurotransmisores como: norepinefrina, GABA, serotonina, regulan la inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ dado que sus receptores están acoplados a proteínas G y esta es dependiente de voltaje. Ligado a esta observación los experimentos de Fenwick y colaboradores (1982) mostraron que un fuerte prepulso despolarizante aumenta la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ en las CCs debido al desacople entre los CCDVs y proteínas G (Dolphin, 1996). Además se mostró que esto un mecanismo limitado de membrana directamente acoplado a proteínas G (Holz et al., 1986; Lewis et al., 1986; Dolphin and Scott, 1987; Hescheler et al., 1987).

Los resultados en este trabajo muestran que todas las CCs de rebanada de glándula adrenal de rata tiene características que convergen con CCs aisladas mantenidas en cultivo primario, las cuales se mencionan a continuación: observamos una ligera inhibición en la amplitud de la $I_{Ca^{2+}}$ durante la parada de flujo, así como la recuperación de la inhibición por pre-pulso; la activación de los receptores purinérgicos y opioidérgicos mediante la aplicación exógena de ATP y Leu-enc inhiben la $I_{Ca^{2+}}$ y la corriente inhibida puede ser recuperada por un fuerte pre-pulso despolarizante en esta misma condición. Por otra parte las CCs en rebanada presentaron notables diferencias ya que mostraron que todas tienen una pequeña modulación

tónica de la I_{Ca}^{2+} dependiente de voltaje, los porcentajes de la I_{Ca}^{2+} que se inhiben por neurotransmisores endógenos o exógenos son menores a lo que está reportado en células aisladas, la corriente recuperada por voltaje fue similar en ausencia y presencia de los antagonistas de receptores purinérgicos y opioidérgicos, suramina y naloxona respectivamente y la presencia de suramina induce un aumento gradual de la I_{Ca}^{2+} independiente de voltaje.

Estos datos sugieren la existencia de modulación por liberación endógena de ATP y opioides de células vecinas, en la rebanada de médula adrenal de rata (modulación paracrina) y/o de la célula en fijación de voltaje que puede estar liberando estos componentes de manera basal (modulación autócrina) (Hernández-Guijo, 1998). Esto es resultado de una posible liberación del contenido vesicular que se induce en respuesta a estímulos específicos, ya que las CCs son excitables eléctricamente y despolarizadas por efecto de la ACh liberada por el nervio esplácnico (Douglas, Kanno y Sampson, 1967; Biales, Dichter y Tischler, 1976; Brandt, Hagiwara, Kidokoro y Ritchie, 1980). Además las CCs poseen canales iónicos dependientes de voltaje para el Na^+ y K^+ similares al de células nerviosas necesarias para la generación de potenciales de acción en reposo sin estimulación del nervio esplácnico (Biales et al., 1976; Ito, Nakazato y Ohga, 1979; Kirpekar y Prat, 1979; Kidokoro y Miyazako, 1976; Kidokoro y Ritchie, 1980; Fenwick et al., 1982), lo cual de acuerdo con las observaciones de Takeda y colaboradores (1997) en rebanada de glándula adrenal, no es afectado porque la inervación nerviosa se mantiene. Estas propiedades en las CCs pueden estar controlando la secreción basal de su contenido vesicular y por lo tanto la modulación basal reportada en este trabajo.

Uno de los primeros proyectos para probar esta hipótesis fue en cultivos primarios de CCs, a las cuales se les aplicó un preparado soluble de vesículas lisadas de CC debido a su contenido de ATP y opioides, se observó que esto inhibe la I_{Ca}^{2+} de una manera dependiente de voltaje y la suramina y naloxona bloqueaban el efecto que inducía esta preparación (Albillos et al., 1996). En otros experimentos se intentó imitar el medio ambiente natural de la glándula adrenal intacta dispersando a las CCs en el cultivo en una alta densidad permitiendo la formación de agrupaciones (Callewaert, Johnson y Morad, 1991). Cuando una célula dentro de un grupo, cuya I_{Ca}^{2+} era explorada, se observaba una fuerte inhibición y recuperación de la corriente por aplicación de un prepulso, esto se observó cuando se estimulaba la secreción de ATP y opioides endógenos en células vecinas con soluciones de Ba^{2+} o alto K^+ , ambos en agrupaciones de CCs humanas (Gandia et al., 1998); CC de bovino y se mostró que las células aisladas no exhiben modulación (Hernández-Guijo et al., 1998).

Con esto se demostró que las células agrupadas reproducen mejor el medio ambiente en la glándula intacta, por que el material secretado durante la activación de las células vecinas puede afectar a una célula modulando sus propiedades eléctricas y actividad secretora. Por tal motivo, los presentes experimentos en rebanada adrenal son los primeros que muestran resultados posiblemente más certeros acerca del mecanismo de modulación autócrino/parácrino de la $I_{Ca^{2+}}$.

En células aisladas, el material liberado por una célula en fijación de voltaje puede ser escaso y rápidamente lavado lejos de los receptores de la superficie celular por el rápido flujo de la solución extracelular. El uso de la condición de flujo y parada de flujo del baño de la célula es un protocolo experimental que aumenta la concentración local de agonistas (neurotransmisores) liberados endógenamente alrededor de la célula permitiendo que aumente la probabilidad de unión a su receptor acoplados a proteínas G e inhibir canales de Ca^{2+} (Doupnik y Pun, 1994; Currie y Fox, 1996, Carbone y García, 1997; García y Carbone, 1996).

Erwin Neher y colaboradores (1982) acentuaron la importancia de tener un estricto control en el flujo de la solución extracelular cuando se registran $I_{Ca^{2+}}$, sobre todo en células secretoras, donde las condiciones de perfusión, pueden modificar el rango y cantidad de material secretado que baña la superficie de la célula. Por este motivo, en nuestros resultados durante una perfusión continua observamos que las CCs presentan rangos variables de inhibición tónica en su $I_{Ca^{2+}}$ dependiente de voltaje, esto sugiere que las CCs en tejido intacto tienen una modulación sostenida de los canales de Ca^{2+} , inducida por la presencia local de agonistas liberados endógenamente como ATP y opioides. Al detener el flujo se favorece la elevación local de neurotransmisores liberados, además aumenta la probabilidad de mantener en el espacio extracelular ACh en las terminales del nervio esplácnico (Doupnik y Pun, 1994; Albillos et. al., 1996; Currie y Fox, 1996), esto podría explicar la recuperación de corriente modulada basal que se observó mediante un fuerte prepulso despolarizante la cual regresa una vez que se reinicia el flujo. Paradójicamente a lo que se esperaba de acuerdo a los resultados obtenidos en parada de flujo en CCs de rata en cultivo (Hernández-Guijo, 1998) y en rebanada de ratón de Hernández y colaboradores (2009) donde se observó una inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ de ~30 %, una diferencia importante respecto a lo que obtuvimos en CCs de rebanadas adrenales de rata (17 %). Este fenómeno puede ser explicado porque la inhibición en la $I_{Ca^{2+}}$ está induciendo una reducción en la liberación de neurotransmisores, indispensable para que se lleve a cabo una inhibición mayor de la corriente (Koh y Hille, 1997; Lim et al., 1997), lo cual sugiere un importante mecanismo de regulación en la $I_{Ca^{2+}}$ y eventualmente en la secreción.

Esta inhibición inducida puede ser revertida reanudando el flujo de la perfusión sobre la superficie de la célula, lavando rápidamente el material liberado, la $I_{Ca^{2+}}$ independiente de voltaje regresa parcialmente sus valores. Sin embargo, la $I_{Ca^{2+}}$ dependiente de voltaje incrementó como una posible alternativa de amortiguamiento a mantener su inhibición tónica, ya que al lavar los neurotransmisores que inducen la inhibición de la corriente, se puede estimular nuevamente la secreción y de esta manera en la corriente dependiente de voltaje se observó una inhibición.

En CCs aisladas de ratón y de bovino, como parte de los productos de secreción, el ATP induce una gran inhibición en la $I_{Ca^{2+}}$ ($51 \pm 3 \%$) y en la liberación de catecolaminas de manera paralela sin alterar el transporte vesicular o la maquinaria exocitótica (Powell et al., 2000). Sin embargo, en CCs en cultivo de rata, el ATP inhibe la excitación por dos mecanismos: inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ y al actuar directamente en la maquinaria secretora por una vía independiente de Ca^{2+} (Lim et al., 1997) la cual consiste en el incremento de cAMP aumentando 20 % la $I_{Ca^{2+}}$ tipo-L (Artalejo et al. 1991), incrementado el número de vesículas listas para liberarse (Carabelli et al., 2003). En conjunto, estos mecanismos pueden inducir un mayor efecto de inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ y la liberación de catecolaminas.

Otro mecanismo de inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ se observa en resultados de Albillos y colaboradores (1996) Kitamura y colaboradores (2001) los cuales sugieren que CCs de bovino y porcino respectivamente, poseen receptores μ -, δ - y κ -opioidérgicos y su activación por sus agonistas inhiben principalmente CCDVs tipo N vía proteínas G, involucrando de este modo la modulación dependiente de voltaje (Cox y Dunlap, 1992; Boland y Bean 1993). En base a esto, nuestros resultados podrían explicar la ligera inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ inducida por la aplicación exógena de opioides en CCs de rata (18 %), dado que la proporción de canales N son menores que en otras especies (30 %) (Gandía et al., 1998) y el pre-pulso despolarizante recupera la corriente inhibida, con lo que se demuestra que la modulación es dependiente de voltaje.

Como se ha mencionado el ATP y Leu-enc utilizados individualmente, tienen efectos heterogéneos en la modulación de la $I_{Ca^{2+}}$ a nivel de los diferentes tipos de canales de Ca^{2+} (HVA) (Aicardi et al., 1991, Albillos et al., 1994; 1996; Hernández-Guijo et al. 1998; 1999; Gandía et al., 1993; Pollo et al., 1993; Carabelli et al., 1998; 2001; Cesetti et al., 2003; Hernández et. al., 2009). Por lo tanto, García y colaboradores (2006) proponen que la aplicación de ATP más opioides exógenos podría promover amplias alteraciones en la inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$, alterando las $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo en nuestros resultados observamos que la aplicación exógena de ATP y Leu-enc indujo una inhibición de la $I_{Ca^{2+}}$ (26%) que no es

significativamente diferente de la inhibición por la aplicación de ATP solo, esto sugiere que la modulación por ATP más Leu-enc no es aditiva y por lo tanto la vía de señalización por la que actúan probablemente es la misma.

Dados los efectos del ATP y Leu-enc, en este trabajo una vía de gran interés por su naturaleza autócrina y parácrina, es la regulación de la I_{Ca}^{2+} por inhibición de CCDVs mediada por proteínas G acopladas a receptores P_{2y} purinérgicos y μ y δ opioidérgicos (GPCRs), (Dolphin y Scott, 1987; Hescheler et al., 1987; Ikeda, 1991; Lewis et al., 1986; Wanke et al., 1987; Hille, 1994), la cual se activa por la liberación endógena de ATP y opioides, inhibiendo restringidamente la amplitud de la corriente de modo que el equilibrio en el rango de la secreción pueda ser eficientemente controlado (Kleppisch, 1992; Gandia, 1993; Albillos et al., 1996; 1996; Carabelli et al., 1998; 2001; Hernandez-Guijo et al., 1999; Carbone et al., 2001). Así mismo el bloqueo de los receptores purinérgicos y opioidérgicos, por sus antagonistas suramina y naloxona respectivamente, restablece los efectos inhibitorios del ATP y Leu-enc, con lo cual se demuestra su importancia en esta vía moduladora de la I_{Ca}^{2+} (Albillos, 1996; Curri y fox, 1996).

Un aspecto importante observado en la inhibición de los canales de Ca^{2+} (HVA) por activación de los receptores P_{2y} , μ y δ por ATP y Leu-enc en CCs de rebanada de glándula adrenal de rata, es que involucra principalmente un mecanismo dependiente de voltaje ya que la inhibición es recuperada un 92 % por un pre-pulso despolarizante, conforme a lo demostrado por Albillos y colaboradores (1996) en la CCs de bovino en cultivo. Sin embargo, en este trabajo observamos además una recuperación de la inhibición tónica de la I_{Ca}^{2+} independiente de voltaje (10 %) al bloquear los receptores P_{2y} con su antagonista, lo cual de acuerdo a lo demostrado recientemente por Hernández y colaboradores en CCs de rebanada de glándula adrenal de ratón podría estar involucrando a los canales tipo L dado que ellos regulan la inhibición independiente de voltaje principalmente, en células neurosecretoras (Albillos et al., 1996; Hernández-Guijo et al., 1999).

A modo de conclusión, demostramos en CCs de rata *in situ* la presencia de una inhibición tónica de la I_{Ca}^{2+} relacionada con la activación de receptores purinérgicos y opioidérgicos por la liberación endógena de ATP y opioides. Con este estudio se espera poder contribuir a un mejor entendimiento de los procesos de regulación y control en la liberación de neurotransmisores y hormonas de las células sin alterar su medio ambiente tisular.

10. Conclusión

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

El uso de la rebanada de tejido adrenal que asemeja el ambiente tisular intacto, nos permitió demostrar que en las CCs de rata existe una inhibición tónica de la I_{Ca}^{2+} , la cual incrementa al permitir la acumulación de los productos secretados con la parada de flujo, demostrando que los neurotransmisores endógenos liberados al medio externo como ATP y/o opioides promueven la disminución de la I_{Ca}^{2+} de manera autócrina y/o parácrina. Esta modulación se recupera al aplicar un fuerte prepulso despolarizante.

La recuperación por un pre-pulso de la I_{Ca}^{2+} disminuida por los productos endógenos liberados al medio por las CCs, así como por la aplicación exógena de ATP y/o opioides demuestra que la inhibición de I_{Ca}^{2+} es mediada por la activación de los receptores P_{2y} , μ y δ – opioides.

La disminución de la I_{Ca}^{2+} en respuesta a neurotransmisores como el ATP y/o opioides observada en este estudio, puede ser fisiológicamente relevante al representar un importante mecanismo de control y evitar la secreción masiva de catecolaminas, evento que podría ser potencialmente letal.

12. Bibliografía

- Addison T.** 1849 On anaemia: disease of the supra-renal capsules. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Ahlquist R.** 1948 A study of the adrenotropics receptors. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Aicardi G, Pollo A, Sher E, Carbone E.** Noradrenergic inhibition and voltage-dependent facilitation of ω -conotoxin sensitive Ca^{2+} channels in insulin-secreting RINm5F cells. *FEBS Lett* 281: 201–204, 1991.
- Aidley D.** The Physiology of Excitable Cells. 3 ed. Cambridge University Press, New York. 1989.
- Albillos A, Artalejo A, Lopez M, Gandia L, Garcia A, Carbone E.** Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *J Physiol* 477:197–213, 1994.
- Albillos A, Carbone E, Gandia L, Garcia AG, Pollo A.** Opioid inhibition of Ca^{2+} channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur J Neurosci* 8: 1561–1570, 1996.
- Albillos A, Gandia L, Michelena P, Gilabert J, del Valle M, Carbone E, Garcia A.** The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 494: 687–695, 1996.
- Albillos A, Garcia A, Olivera B, Gandia L.** Re-evaluation of the P/Q Ca^{2+} channel components of Ba^{2+} currents in bovine chromaffin cells superfused with solutions containing low and high Ba^{2+} concentrations. *Pflügers Arch* 432: 1030–1038, 1996.
- Amico C, Marchetti C, Nobile M, Usai C.** Pharmacological types of calcium channels and their modulation by baclofen in cerebellar granules. *J Neurosci* 15: 2839–2848, 1995.
- Arnold J.** 1866 Ein Beitrag zu der feineren Structur und dem Chemismus der Nebennieren. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Artalejo C, Adams M, Fox A.** Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367: 72–76, 1994.
- Artalejo C, Ariano M, Perlman R, Fox A.** Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism. *Nature* 348: 239–242, 1990.
- Artalejo C, Dahmer M, Perlman R, Fox A.** Two types of Ca^{2+} currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. *J Physiol* 432:681–707, 1991.
- Artalejo C, Mogul D, Perlman R, Fox A.** Three types of bovine chromaffin cell Ca^{2+} channels: facilitation increases the opening probability of a 27 pS channel. *J Physiol* 444: 213–240, 1991.
- Artalejo C, Perlman R, Fox A.** ω -conotoxin GVIA blocks a Ca^{2+} current in bovine chromaffin cells that is not of the “classic” N type. *Neuron* 8:85–95, 1992.
- Artalejo C, Rossie S, Perlman R, Fox A.** Voltage-dependent phosphorylation may recruit Ca^{2+} current facilitation in chromaffin cells. *Nature* 358: 63–66, 1992.
- Artalejo C.** More on calcium currents. *Trends Neurosci* 20: 448–450, 1997.
- Artelejo A.** Electrical Properties of Adrenal Chromaffin Cells. Capitulo 12 en: “The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells”. Scherübl H y Hescheler J Editores. CRC press. 1995
- Aunis D.** Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol* 181: 213–320, 1998.
- Barbara J, Poncer J, McKinney R, Takeda K** (1998) An adrenal slice preparation ofr the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J Neurosci Meth.* 80: 181-189.
- Bean B.** Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340(6229):153-6, 1989.
- Becherer U, Moser T, Stümer W, Oheim M.** Calcium Regulates Exocytosis at the Level of Single Vesicles. *Nat. Neurosci.* 8: 846-853, 2003.

- Bernard C.** 1855 Remarques sur la sécrétion de sucre dans le foie faites à l'occasion de la communication de M. Lehmann. C. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Berne R, Levy M, Bruce S. Bruce K.** Principles of Physiology. Louis, Missouri 4th ed. Elsevier Mosby, 2006.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M.** The I-II loop of the Ca²⁺ channel α (1) subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the β subunit. *Neuron* 25:177–190, 2000.
- Blaschko H.** 1973 Catecholaminebiosynthesis. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Bley K, Tsien R.** Inhibition of Ca²⁺ and K⁺ channels in sympathetic neurons by neuropeptides and other ganglionic transmitters. *Neuron* 4: 379–391, 1990.
- Bloom F.** Electron Microscopy of catecholamine containing structures. en; Blaschko H, Muscholl E. Eds. Catecholamines, Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 33. Berlin: Springer – Verlag, 1972:45-78
- Boarder R, Marriott D, Adams M.** Stimulus secretion coupling in cultured chromaffin cells. Dependency on external sodium and on dihydropyridine-sensitive calcium channels. *Biochem Pharmacol* 136(1):163-7. 1987.
- Boland L, Bean B.** Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J Neurosci* 13: 516–533, 1993.
- Borle B.** Control, modulation and regulation of cell calcium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 190:13–153, 1981.
- Brice N, Berrow N, Campbell V, Page K, Brickley K, Tedder I, Dolphin A.** Importance of the different β subunits in the membrane expression of the α 1A and α 2 calcium channel subunits: studies using a depolarisation-sensitive α 1A antibody. *Eur J Neurosci* 9:749–759, 1997.
- Brow-Séguard C.** 1856 Recherches expérimentales sur la physiologie et la pathologie des capsules surrenales. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Burgoyne R. Morgan A.** Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83: 581–632, 2003.
- Burnstock G.** 1987 Mechanisms of interaction of peptide and nonpeptide vascular neurotransmitter systems. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Callewaert G, Johnson R, Morad M.** Regulation of the secretory response in bovine chromaffin cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 260: C851–C860, 1991.
- Cannon W.** Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9: 399–431, 1929.
- Carabelli V, Carra I, Carbone E.** Localized secretion of ATP and opioids revealed through single Ca²⁺ channel modulation in bovine chromaffin cells. *Neuron* 20: 1255–1268, 1998.
- Carabelli V, Hernandez-Guijo J, Baldelli P, Carbone E.** Direct autocrine inhibition and cAMP-dependent potentiation of single L-type Ca²⁺ channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 532:73–90, 2001.
- Carbone E, Carabelli V, Cesetti T, Baldelli P, Hernández-Guijo J, Giusta L.** G-protein- and cAMP-dependent L-channel gating modulation: a manyfold system to control calcium entry in neurosecretory cells. *Pflügers Arch.* 442:801-13. Review., 2001
- Carbone E, Garcia A.** The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 494: 687–695, 1996.
- Carbone E, Lux H.** A low voltage-activated fully inactivating Ca²⁺ channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 310: 501-502, 1984.
- Carmichael S.** 1986, Morphology and innervation of the adrenal medulla. In: Rosenheck K, Lelkes P (eds) Stimulus secretion coupling, vol. 1. CRC, Boca Raton, Fla., pp 1–29
- Catterall W.** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-55. Review. 2000
- Cesetti T, Hernandez-Guijo J, Baldelli P, Carabelli V, Carbone E.** Opposite action of β 1- and β 2-adrenergic receptors on Ca(V)₁ L-channel current in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 23: 73–83, 2003.

- Cheek T, Barry V.** Stimulus-secretion coupling in excitable cells: a central role for calcium. *J Exp Biol* 184: 183–196, 1993.
- Chien A, Zhao X, Shirokov R, Puri T, Chang C, Sun D, Rios E, Hosey M.** Roles of a membrane-localized β subunit in the formation and targeting of functional L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 270:30036–30044, 1995.
- Coupland R.** 1972 The chromaffin system. In Blaschko H, Mucoll E. eds Catecholamines, Handbook of Experimental . Vol 33. Berlin: Springer-Verlag: 16-39, 1972.
- Coupland R.** The natural history of the chromaffin cell—twenty five years on the beginning. *Arch. Histol. Cytol.* 52: 331-341, 1989.
- Coupland R.** The natural history of the chromaffin cell. Longmans, London 1965
- Cox D, Dunlap K.** Pharmacological discrimination of N-type from L-type calcium current and its selective modulation by transmitters. *J Neurosci* 12: 906–914, 1992.
- Currie K, Fox A.** ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca^{2+} channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron* 16: 1027–1036, 1996.
- De Waard M, Pragnell M, Campbell K.** Ca^{2+} channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron* 13:495–503, 1994.
- Deisz R, Lux H.** gamma-Aminobutyric acid-induced depression of calcium currents of chick sensory neurons. *NeurosciLett* 56: 205–210, 1985.
- Diverse-Pierluissi M, Dunlap K, Westhead E.** Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1261–1265, 1991.
- Dolphin A.** Facilitation of Ca^{2+} current in excitable cells. *Trends Neurosci* 19: 35–43, 1996.
- Dolphin A.** G Protein Modulation of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 55:607–627, 2003.
- Dolphin A, Scott R.** Calcium channel currents and their inhibition by (-)-baclofen in rat sensory neurones: modulation by guanine nucleotides. *J Physiol* 386: 1–17, 1987.
- Dolphin A.** The G. L. Brown prize lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Experimental Physiology Review* 80, 1-36. 1995.
- Douglas W, Rubin P.** The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40–57, 1961.
- Douglas W.** Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34: 453–474, 1968.
- Doupnik C, Pun R.** G-protein activation mediates prepulse facilitation of Ca^{2+} channel currents in bovine chromaffin cells. *J Membr Biol* 140: 47–56, 1994.
- Dubel S, Starr T, Hell J, Ahljianian M, Enyeart J, Catterall W, Snutch T.** Molecular cloning of the α -1 subunit of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5058–5062, 1992.
- Dunlap K, Fischbach G.** Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 317: 519–535, 1981.
- Eränkö O.** On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta. Anat* 16, suppl.: 17: 1-60, 1952.
- Ertel E, Campbell K, Harpold M, Hofmann F, Mori Y, et al.** 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25:533–35
- Eustachius B.** 1774 Tabulae Anatomicae. Lancisius B. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Fenwick E, Marty A, Neher E.** A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 331: 577-597, 1982.
- Fischer-Colbrie R., Hagn C., Schober M.,** 1987 Chromogranins A, B and C: widespread constituents of secretory vesicles. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.

- Furchgott R. F.**, The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors): an evaluation from the standpoint of receptor theory. In Blaschko H., Muscholl E., eds Catecholamines, Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 33 Berlin: Springer-Verlag, 1972:283-335.
- Gagnon R.** 1957 The arterial supply of the human adrenal gland. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Gandia L, Garcia A, Morad M.** ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *J Physiol* 470: 55–72, 1993.
- Gandia L, Mayorgas I, Michelena P, Cuchillo I, de Pascual R, Abad F, Novalbos J, Larranaga E, and Garcia A.** Human adrenal chromaffin cell calcium channels: drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflügers Arch* 436: 696–704, 1998.
- Garcia A, Carbone E.** Calcium-current facilitation in chromaffin cells. *Trends Neurosci* 19: 383–385, 1996.
- García A, García-De-Diego A, Gandía L, Borges R, García-Sancho J.** Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86:1093-131, 2006.
- Geffen L, Livett B.** 1971 Synaptic vesicles in sympathetic neurons. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Ghosh A, Greenberg M.** Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*; 268: 239–47, 1995.
- Grimaldo A. J I.** Glándula Suprarrenal. Capítulo VIII.5 en: Fisiología: células, órganos y sistemas. Muñoz Martínez E J, García X. Ediciones Científicas Universitarias, México 1997.
- Hamaji M, Miyata M, Kawasshima Y.** 1985 A study of the vascular arrangement of the rat adrenal gland using non-radioactive microspheres. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85–100, 1981.
- Heinsimer J, Lefkowitz R.** 1982 Adrenergic receptors: biochemistry, regulation, molecular mechanism, and clinical implications. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Herlitze S, Garcia D, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall W.** Modulation of Ca²⁺ channels by G-protein β -gamma subunits. *Nature (Lond)* 380:258–262. 1996
- Hernandez-Guijo J, Carabelli V, Gandia L, Garcia A, Carbone E.** Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 11: 3574–3584, 1999.
- Hernandez-Guijo J, de Pascual R, Garcia A, and Gandia L.** Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflügers Arch* 436: 75–82, 1998.
- Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G.** The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325: 445–447, 1987.
- Hille B.** G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9: 187–195, 1992.
- Hille B.** Ions channels of excitable membranes. 3ed. Sinauer Associates, Sunderland , MA, 2001.
- Hille B.** Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci* 17(12):531-6 Review, 1994.
- Hollins B. Ikeda S.** Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol* 76: 1195– 1211, 1996.
- Holz G, Rane S, Dunlap K.** GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 319: 670–672, 1986.
- Huber K., Kalcheim C. Unsicker K,** The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest, *Auton. Neurosci* 151(1):10-6, 2009.

- Ikeda S.** Double-pulse calcium channel current facilitation in adult rat sympathetic neurones. *J Physiol* 439: 181–214, 1991.
- Insel P.** 1984 Identification and regulation of adrenergic receptor in target cells. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Jenkinson D. H.,** 1973 Classification and properties of peripheral adrenergic receptors. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish M, Iijima T.** Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol* 47:449-64, 1997.
- Kasai H.** Voltage- and time-dependent inhibition of neuronal calcium channels by a GTP-binding protein in a mammalian cell line. *J Physiol* 448:189-209, 1992.
- Kaufman S. Friedman S.** 1965 Dopamine- β hydroxylase. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Kirpekar S, Puig M.** Effect of flow-stop on noradrenaline release from normal spleens and spleens treated with cocaine, phentolamine or phenoxybenzamine. *Br J Pharmacol* 43: 359–369, 1971.
- Kleppisch T, Ahnert-Hilger G, Gollasch M, Spicher K, Hescheler J, Schultz G, Rosenthal W.** Inhibition of voltage-dependent Ca^{2+} channels via $\alpha 2$ -adrenergic and opioid receptors in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch* 421: 131–137, 1992.
- Konh A.** 1902 Das chromaffine Gewebe. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Kopin I.** 1977 Catecholamine metabolism (and the biochemical assessment of sympathetic activity). Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Kuo C, Bean B.** G-protein modulation of ion permeation through N-type calcium channels. *Nature* 365(6443):258-62, 1993.
- Landsberg L, Young J.** Catecholamines and the adrenal medulla. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Landsberg L, Young J.** Catecholamines and the adrenal medulla. En: Bondy P. K., Rosenberg L. E., eds. Metabolic control and Disease. 8th ed Philadelphia: W. B. Saunders, 1980: 1621-1693.
- Landsberg L.** Catecholamines and the sympathoadrenal system. En Ingbar S. H., The year in Endocrinology. New York: Plenum, 1976: 177-231.
- Le Douarin N, Teillet M.** 1974 Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Levy M, Blattberg B.** 1976 Effect of vagal stimulation on the overflow of norepinephrine into the coronary sinus during cardiac sympathetic nerve stimulation in the dog. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Lewis D, Weight F, Luini A.** A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium current by somatostatin in a pituitary cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9035–9039, 1986.
- Lingle C, Solaro C, Prakriya M, Ding P.** 1996 Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels* 4, 261–301.
- Livett B.** Chromaffin cells: roles for vesicle proteins and Ca^{2+} in hormone secretion and exocytosis. *Trends Pharmacol Sci* 14: 345–348, 1993.
- Lockhart R, Hamilton G, Fyfe F.** Anatomía humana; traducción Alberto Folch Y Pi y Homero Vela. Ed. Interamericana. México. 1988
- Lovenverg W, Weissbach H, Udenfriend S,** 1962 Aromatic-L-amino acid decarboxylase. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Luebke J, Dunlap K.** Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflügers Arch* 428: 499–507, 1994.

- Marchetti C, Carbone E, Lux H.** Effects of dopamine and noradrenaline on Ca²⁺ channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Arch* 406: 104–111, 1986.
- Martin A, Mathieu M, Chevillard C, Guerineau N.** Gap junctions mediate electrical signalling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci* 21: 5397–5405, 1991.
- Matteson D, Armstrong C.** Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J. Gen. Physiol.* 87: 161–182, 1986.
- Millhorn D, Hokfelt T.** 1988 Chemical messengers and their coexistence in individual neurons. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Mori Y, Friedrich T, Kim M-S, Mikami A, Nakai J, Ruth P, Bosse E, Hofmann F, Flockerzi V, Furuichi T.** Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature (Lond)* 350:398–402, 1991.
- Moskowitz M.** 1977 Diseases of the autonomic nervous system. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Neher E.** Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389–399, 1998.
- Ninomiya Y, Kishimoto T, Yamazawa T, Ikeda H, Miyashita Y, Kasai H,** Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles. *EMBO J.* 16, 929–934, 1997
- Norman A, Litwack G.** Hormones. 2 ed. Academic Press, San Diego California USA. 1997
- Ogata N, Yoshiaki O.** Molecular diversity of Structure and Function of the Voltage-Gated Na⁺ Channels. *Jpn. J. Pharmacol.* 88: 365–377, 2002.
- Penner R, Neher E.** The role of calcium in stimulus-secretion coupling in excitable and non-excitable cells. *J Exp Biol* 139: 329–345, 1988.
- Perlman R, Chalfie M.** 1977 Catecholamine release from the adrenal medulla. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Phillips J, Pryde J.** 1987 The chromaffin granule; a model system for the study of hormones and neurotransmitters. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Pollet R, Levey G.** 1980 Principles of membrane receptor physiology and their application to clinical medicine. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Pollo A, Lovallo M, Biancardi E, Sher E, Soggi C, Carbone E.** Sensitivity to dihydropyridines, omega-conotoxin and noradrenaline reveals multiple high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat insulinoma and human pancreatic beta-cells. *Pflüger Arch* 423:462–471, 1993.
- Pollo A, Lovallo M, Sher E, Carbone E.** Voltage-dependent noradrenergic modulation of ω-conotoxin-sensitive Ca²⁺ channels in human neuroblastoma IMR32 cells. *Pflügers Arch* 422: 75–83, 1992.
- Role L.** 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.
- Sargent P.** The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 403–443, 1993.
- Schäfer E.** 1895 Address in physiology on internal secretions. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Schegel W, Mollard P.** Electrical activity and stimulus-secretion coupling in neuroendocrine cells. Capitulo 3 en: “The electrophysiology of Neuroendocrine cells”. Scherubl H y Hescheler J. Editores, CRC press, 1995.
- Scoenwetter H.** 1968 Zur Vorgeschichte der Endokrinologie. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.

- Shäfer E.** 1895 Address in physiology on internal secretions. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Singer D, Biel M, Lotan I, Flockerzi V, Hofmann F, Dascal N.** The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science (Wash DC)* 253:1553–1557, 1991.
- Smith A, Winkler H.** Fundamental mechanisms in the release of catecholamines. En: Blaschko H, Muscholl E. Eds. Catecholamines, Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 33. Berlin: Springer – Verlag, 1972:538–617.
- Somlyo A, Somlyo A.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231–6. 1994
- Soong T, Stea A, Hodson C, Dubel S, Vincent S, Snutch T.** Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science (Wash DC)* 260:1133–1136, 1993.
- Stjarne L.** 1966 Storage particle in noradrenergic tissues. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992. *Pharmacol Rev.* 18: 425-432.
- Swartz K.** Modulation of Ca²⁺ channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron* 11: 305–320, 1993.
- Teillet M, Le Douarin N.** 1974 Determination of the level of the origin of the adrenal medulla cells in the neural axis using heterospecific grafts of quail neural rudiments on chick embryos. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Tipton K.** 1973; Biochemical aspects of monoamine oxidase. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Tischler A S.** Chromaffin cells as Model of Endocrine Cells and Neurons. *Ann. NY Acad. Sci.* 971: 366-370, 2002.
- Tortora G, Derrickson B.** Principios de Anatomía y Fisiología. Capítulos 12, 17 y 18. OXFORD. Médica Panamericana. 2006
- Tortora G, Grabowski S.** Principios de anatomía y fisiología. 7a ed. Oxford University, México. 2002
- Trifaró J.** Molecular Biology of the Chromaffin Cell. *Ann. NY Acad. Sci.* 971: 11-18, 2002.
- Trifaró J, Fournier S.** Calmodulina and chromaffin cell secretion. En: Dahlstrom A, Belmaker R, Sandler M eds. Progress in Catecholamines Research. Part A Basic Aspects and Peripheral Mechanisms. New York; Alan R. Liss, 1988:257-262.
- Vaccro K, Liang B, Perelle B.** 1980 Tyrosine 3-monoxygenase regulates catecholamine synthesis in pheochromocytoma cells. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Verdugo D.** Médula suprarrenal. Capítulo 50 en: “Fisiología Médica”. Drucker C. Editorial El Manual Moderno, México. 2005
- Viveros O, Wilson S, Chang K-J.** Regulation of synthesis and secretion of enkephalins and related peptides in adrenomedullary Chromaffin cells and human pheochromocytoma. In: Costa E., Trabucchi M., eds. Regulatory Peptides: From Molecular Biology to function. New York: Raven, 1982; 217-224.
- von Kölliker A.** 1961 Entwicklungsgeschichte des Menschen und höheren Thiere. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Wanke E, Ferroni A, Malgaroli A, Ambrosini A, Pozzan T, Meldolesi J.** Activation of a muscarinic receptor selectively inhibits a rapidly inactivated Ca²⁺ current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4313–4317, 1987.
- Welch J.** 1953 Catecholamines in the invertebrates. In Blaschko H, Muscholl E. Eds. Catecholamines, Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 33. Berlin: Springer – Verlag, 1972: 79-105
- Wickman K, Clapham D.** G-protein regulation of ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 278—285, 1995.
- Winkler H, Sietzen M, Schober M.** The life cycle of catecholamine- storing vesicles. *Ann NY Acad Sci* 493: 3–19, 1987.

Winkler H, Westhead E. The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*; 5(11):1803-23, 1980.

Wurtman R, Axelrod J. 1966 Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.

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.

Yoshimasa T, Nakao K, Ohtsuki H. 1982 Methionine- and leucine- enkephalin in human sympathoadrenal system and pheochromocytoma. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.