



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ANÁLISIS ESPECTROFLUOROMÉTRICO DE LAS  
VARIACIONES DE CALCIO INTRACELULAR EN  
CÉLULAS CROMAFINES DE RATÓN EN TEJIDO  
INTACTO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**ADÁN LARA MEJÍA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

**2010**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**“La mejor forma de tener una buena idea es tener un montón de ideas”**

**-Linus Pauling-**

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

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

**A MI HIJA, MI UNIVERSO, ALMA Y VIDA.**

**A MI PADRE, MI SOL;  
MI AMOR, MI MADRE**

**MIS UNIVERSOS:  
YUL AMOR, LUZ MANUEL, ARAL, RAMIRO, Y BEATRIZ.EUGENÍA  
QUE HAN SIDO MI FORTALEZA, GUÍA, PENSAMIENTO, CORAJE Y RAZÓN.**

**A MIS NUEVOS SOLES:  
VANESSA,  
ARAL BARUCH,  
MARÍA FERNANDA,  
...**

**A LA LUNA**

**RESUMEN.....VI**

**ÍNDICE.....VII**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sistema nervioso autónomo e inervación de la glándula suprarrenal .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 La glándula suprarrenal y su porción medular .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.1 Vascularización de la médula adrenal .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Las células cromafines .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 Histogénesis de las células cromafines .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Las catecolaminas.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.1 Síntesis y efecto biológico.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.2 Secreción de catecolaminas y otros productos metabólicos .....</b>	<b>14</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Mecanismos de acción de las células cromafines .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Actividad eléctrica en células cromafines.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1 Mecanismo de facilitación y activación colinérgica en células cromafines.....</b>	<b>21</b>
<b>2.3 Los Canales de calcio.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1 Canales de calcio activados por unión de ligando .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2 Activación de canales de calcio dependiente de calcio .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.3 Canales de calcio dependientes de voltaje.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Inactivación de los canales de calcio.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5 Secreción y mecanismo de exocitosis .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Uniones comunicantes.....</b>	<b>31</b>

<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Objetivos particulares .....</b>	<b>35</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1 Preparación de rebanadas de adrenales .....</b>	<b>36</b>
<b>6.1.1 Cargado de las rebanadas con el marcador calcio .....</b>	<b>37</b>
<b>6.2 Registro de La actividad de calcio.....</b>	<b>38</b>
<b>6.2.1 Adquisición de imágenes .....</b>	<b>38</b>
<b>6.2.2 Microscopía confocal.....</b>	<b>40</b>
<b>6.3 Análisis de la actividad de calcio intracelular .....</b>	<b>41</b>
<b>6.4 Análisis estadístico .....</b>	<b>44</b>
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>9. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>63</b>

## RESUMEN

Basalmente o en respuesta a estrés, las células cromafines de la médula adrenal secretan catecolaminas las cuales activan o inhiben señales en distintos órganos diana. Esta secreción forma parte de los mecanismos de regulación homeostática que son mediados parasimpáticamente por el sistema nervioso autónomo de los vertebrados.

El incremento en la concentración de calcio intracelular es uno de los eventos necesarios para la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática y en consecuencia la liberación de su contenido al espacio extracelular. La utilización de un marcador fluorescente de calcio intracelular permite observar dichos cambios y considerarlos una medida indirecta de la secreción.

La generación de microdominios de calcio intracelular, puede hacerse partícipe en distintos procesos intracelulares; siendo resultado de diversos factores como la segregación de canales iónicos en la superficie de la membrana plasmática, la disposición intracelular de la organela o las interacciones celulares. Estos tipos de arreglo, implican repercusiones importantes sobre el control fino de la secreción. Por lo anterior, en el presente trabajo observamos la actividad de calcio interno en células medulares mediante la preparación *in situ* de rebanadas de glándula suprarrenal en distintas regiones de la célula y en diversas células dentro del tejido adrenomedular.

Identificamos diferentes patrones en el incremento del calcio intracelular en células con actividad espontánea. Dichas células presentan señales transitorias de calcio en zonas centrales o intracelulares respecto a las submembranales y viceversa. Mostramos los porcentajes de células con actividad espontánea y de células reclutadas por la acción de una concentración elevada de potasio; además de la proporción de células con actividad persistente en ausencia de calcio extracelular. Identificamos los patrones de oscilación de calcio intracelular de células en conjunto, reconociendo una evidente actividad secuencial y sincrónica en módulos o grupos.

El conjunto de observaciones realizadas mediante esta técnica, provee evidencia a hipótesis recientes sobre las implicaciones fisiológicas del arreglo y la disposición espacial de las células y sus elementos conservados en el tejido intacto.

## 1. INTRODUCCIÓN

Antes de que Walter Cannon a principios del siglo XX estudiara los mecanismos implicados en la regulación del ambiente interno de los organismos y acuñara el término homeostasis; ya habían surgido dudas sobre los procesos involucrados en la estabilidad del ambiente interno, el “*milieu interiour*” planteado por Claude Bernard en 1878. Cannon considera las principales anotaciones de los fisiólogos contemporáneos y reconoce que los seres vivos, vistos como un sistema abierto, pueden reaccionar ante los cambios en el entorno manteniendo las variaciones internas dentro de estrechos límites gracias a ajustes automáticos que intervienen en el sistema, y que las oscilaciones abruptas pueden ser prevenidas para que las condiciones internas logren mantenerse casi constantes (Cannon W.B, 1929).

La homeostasis se refiere a que todas las pequeñas variables fisiológicas se mantienen en un nivel óptimo, dentro de estrechos márgenes por las acciones de diversos mecanismos de control en los organismos (Gwartz, 2008). Las particularidades de una especie o individuo dependen de su capacidad para conservar dentro de sus procesos vitales ciertas características que los diferencian de otras especies, y para ser posible la evolución, ha sido necesario contar con la maquinaria idónea para mantener constancia en la organización y funcionamiento de los sistemas de los organismos (Fanjul et al. Eds., 1998). Los mecanismos de regulación están operados principalmente por los sistemas nervioso y endocrino. En el sistema nervioso autónomo, es de gran relevancia funcional la actividad del sistema simpatoadrenal que entre sus diversos elementos incluye a las células cromafines (CC) de la médula adrenal (Fanjul et al. 1998; Verdugo, 2005; García et al. 2006; Díaz-Flores et al. 2008).

## **1.1 Sistema nervioso autónomo e inervación de la glándula suprarrenal**

El sistema nervioso autónomo (SNA) controla las funciones involuntarias y consiste en tres divisiones. La división entérica forma redes de neuronas llamadas plexos que rodean el tracto gastrointestinal, esta no es del todo independiente ya que también está controlada por el SNC a través de fibras simpáticas y parasimpáticas. Dichas fibras son dirigidas en múltiples respuestas en dirección paralela y ocasionalmente simultánea, actuando sobre los músculos lisos y las glándulas secretoras; los vasos sanguíneos y la piel (Richelson, 2003).

La división parasimpática o sistema nervioso parasimpático (SNP) organiza las respuestas involuntarias que generalmente reflejan funciones en estado de relajación (Willis, 2004). La división simpática o sistema nervioso simpático (SNS) organiza las respuestas involuntarias que anticipan el esfuerzo máximo o la acción de lucha-huida, y regula un amplio número de funciones y durante estados físicos o emocionales extremos, activa entre otros al sistema cardiovascular y el catecolaminérgico adrenal (simpatoadrenal). Dichos sistemas, consisten en cadenas de neuronas de proyecciones duales que los conectan con el sistema nervioso central (SNC) (neuronas de comendo central) (Jansen et al. 1995). Los axones preganglionares simpáticos nacen de neuronas en la médula espinal torácica y lumbar superior T1 a L2/L3 (Richelson, 2003, Willis 2004).

Los axones que inervan la glándula suprarrenal provienen de los segmentos torácicos 10, 11 y 12, y del 1er. lumbar (L1) (Verdugo 2005); los cuales penetran la cápsula adrenal y la corteza sin ramificarse, pasan a la médula y se dividen en pequeños paquetes de fibras nerviosas que finalizan en terminales tipo sinápticas sobre CC. Muchas de las fibras carecen de mielina y algunas forman complejos axón-células de Schwann en la capa subcortical y entre los módulos de células productoras de adrenalina (A) y de noradrenalina (NA) (Díaz-Flores et al. 2008).

## **1.2 La glándula suprarrenal y su porción medular**

La glándula suprarrenal o glándulas suprarrenales son consideradas un órgano multifuncional localizado, como su nombre lo indica sobre cada riñón y se divide en dos principales componentes: corteza y médula. La corteza adrenal de origen mesodérmico está formada por tres zonas principales: la externa o glomerular que sintetiza mineralocorticoides, la media o fascicular produce glucocorticoides y la interna o reticular que sintetiza andrógenos.

En el humano la corteza adrenal corresponde al 90% del total de la glándula suprarrenal, y varía en ligeras proporciones en otros animales, en ratones conforma alrededor del 75-85%. La porción medular o médula adrenal esta compuesta predominantemente por CC de derivación neuroectodérmica y está envuelta por la corteza adrenal (Verdugo, 2005) (Figura 1.1). Existe evidencia que muestra una relación funcional entre estos dos sistemas endócrinos, tanto en la respuesta que se genera de forma conjugada y paralela; así como la influencia que pueden tener diversos productos corticoides en procesos del desarrollo de las CC medulares, aunque no en todos los vertebrados se presenta dicha condición, por ejemplo, en peces, el tejido cromafín está separado de las células esteroideogénicas, pero todas en general se localizan en la región general de los riñones en dirección cefálica (Randall et al. 1997).

Aparte de CC adrenérgicas y noradrenérgicas, la población celular de la medula adrenal incluye: CC de gránulos pequeños, células ganglionares, células sustentaculares, nervios, vasos sanguíneos y tejido conectivo (Díaz-Flores et al. 2008). Las CC se encuentran en racimos o trabéculas, mientras las células ganglionares se encuentran solas o en racimos intercaladas con CC o en asociación con fibras nerviosas. Las células sustentaculares se encuentran en la periferia de los racimos de CC (Fung et al. 2008).

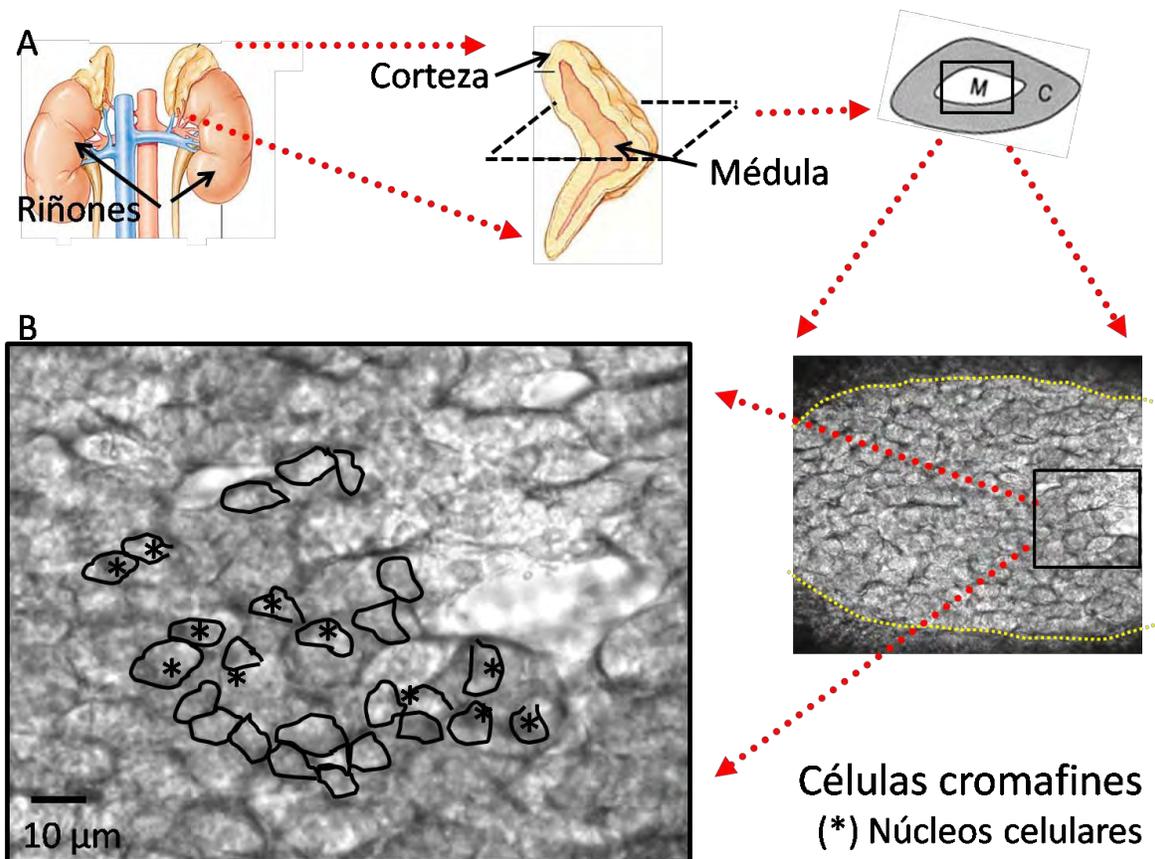


Figura 1.1. Corte transversal de la glándula suprarrenal que muestra las células cromafines de la médula adrenal. (A) Riñones y glándula suprarrenal (modificado de [http://www.bio-medicine.org/biology-dictionary/Adrenal\\_glands/](http://www.bio-medicine.org/biology-dictionary/Adrenal_glands/) por Carlyn Iverson). (B) Células cromafines medulares. (\*) Núcleos celulares.

(A) Imagen en contraste de fases en el microscopio por - Lara-Mejía A., 2008).

### 1.2.1 Vascularización de la médula adrenal

Dentro de los mamíferos la vascularización de la médula adrenal, puede presentar alta similitud, aunque con sutiles diferencias. Por ejemplo, en ratas, el grupo de Murakami y colegas (1989) por medio de microscopia electrónica, mostraron que las arterias adrenales provienen de la arteria frénica inferior, la aorta abdominal y la arteria renal; sus ramificaciones internalizan la glándula adrenal. Las arterias adrenales, alcanzan la superficie de la glándula superior, medial e inferior. Esta vascularización es drenada por la vena periadrenal superior y posteriormente a la vena frénica inferior y por las venas

mediales y periadrenales inferiores que fluyen hacia la vena adrenal (Murakami et al. 1989).

En humanos el aporte sanguíneo deriva de tres arterias: la suprarrenal superior, la suprarrenal media y la arteria suprarrenal inferior; las cuales forman un plexo que penetra desde la parte periférica de la corteza suprarrenal hacia el centro mediante un sistema sinusoidal orientado en forma radial (figura 1A). La sangre venosa es drenada por una única vena central: la vena suprarrenal derecha, la cual conduce a la vena cava inferior y la izquierda a la vena renal izquierda (Verdugo 2005). Después del nacimiento se presenta una degeneración de la corteza fetal y durante la formación de la nueva corteza, las “islas” de células neuroblásticas se sitúan contra la vena central, y alcanzan una estructura compacta altamente vascularizada en la parte central de la glándula adrenal (Sokolov et al 2006).

### **1.3 Las Células Cromafines**

Las CC reciben su nombre por la reacción a fijadores como el dicromato de potasio o el ácido crómico, provocando una tinción café o amarillo como producto de la oxidación (Norris, 1996). Aunque algunas otras células como células del epitelio intestinal o de la piel, o diversas células serotoninérgicas (secretoras de serotonina derivado del amino ácido triptófano) pueden presentar la llamada “reacción cromafín”; las CC de la médula adrenal derivan de la cresta neural (Artalejo A. 1995) y pueden ser consideradas paraganglios intradrenales del sistema paraganglionar que incluye los ganglios autónomos paravertebrales, intravagales, branquioméricos y viscerales (Díaz-Flores et al. 2008).

Las CC muestran una forma poligonal o columnar en el tejido medular adrenal, poseen un núcleo redondo o elíptico (ocasionalmente 2 o más) de colocación central más frecuente que excéntrica, y uno, dos o tres nucléolos. El citoplasma contiene gránulos cromafines y la organela ordinaria; incluyendo un gran aparato de Golgi, retículo

endoplásmico rugoso, ribosomas libres, mitocondrias redondas u ovaladas con estrechas crestas paralelas, lisosomas, vacuolas, cuerpos multivesiculares, microtúbulos, microfilamentos, centriolos y ocasionalmente cilia (Díaz-Flores et al. 2008).

Utilizando la reacción de oxidación con yodato de potasio Hillarp y Hökfelt (1954), observaron la presencia de dos poblaciones de CC noradrenérgicas y adrenérgicas en médulas adrenales de ratas, puercos de Guinea, conejos, gatos, ovejas, vacas y caballos (Hillarp, Hökfelt, 1954). Glavinovic y colaboradores (1998) analizaron morfométrica y electroquímicamente la liberación del contenido vesicular de CC a fin de determinar la relación con el volumen y el contenido liberado, y encontraron que las vesículas de células noradrenérgicas son de mayor tamaño que las adrenérgicas. En otro estudio, mediante microscopia electrónica se reconocieron estas diferencias morfológicas y con el uso de microscopio óptico y métodos histoquímicos, se ha reconocido que una gran cantidad de CC adrenérgicas se localizan en la periferia de la médula adrenal y que las CC noradrenérgicas ocupan la posición central formando grupos (Koval et al. 2000).

A pesar de los diversos datos sobre poblaciones de CC separadas, la proporción (radio) de células adrenérgicas/noradrenérgicas es extremadamente variable, tanto que puede ir de 1:2 a 6:1, lo cual hace suponer que la misma CC puede contener tanto A como NA (Koval et al., 2000). Las CC presentan un alto grado de plasticidad, teniendo capacidad para cambiar su fenotipo en respuesta a estimulación por factores neurotróficos (Doupe et al. 1985; Koval et al. 2000); y pueden ser inducidas para expresar características neuronales con crecimiento neurítico (Doupe et al. 1985; Moro et al. 1991; Díaz-Flores et al. 2008).

En un cultivo aislado de células medulares adrenales bovinas, Koval y colaboradores (2000), tomaron en cuenta cuatro principales criterios para la identificación morfológica de las células estos fueron: el diámetro medio de los gránulos que presentan, la

variabilidad de dichos gránulos, la densidad y el halo o anillo de los gránulos, y la densidad del citoplasma o el núcleo. Y considerando la expresión de otros componentes celulares caracterizaron cuatro subtipos de CC morfológicamente distintos: CC medulares con citoplasma denso y gránulos finos (49.1%), CC con citoplasma denso y gránulos grandes (21.1%), CC con citoplasma difuso y gránulos con anillo luminoso (26.3%), y CC con citoplasma moderadamente denso y retículo endoplásmico rugoso bien expresado (3.5%) (Koval e t al., 2000).

### **1.3.1 Histogénesis de las células cromafines**

Existen varios tipos celulares que sintetizan y secretan polipéptidos hormonales. Pearse (1968) reconoce y describe un número de características ultraestructurales que son compartidas por diversas células y las describe como células APUD (*amine precursor uptake and decarboxilation*, -captura y descarboxilación de precursores de aminas-) (Pearse, 1968). Este grupo de células incluye a corticotropos y melanotropos de la pituitaria, células de los islotes pancreáticos, células productoras de calcitonina, células tipo I del cuerpo carótido, células de la médula adrenal y varias células endócrinas del epitelio intestinal (Le Dourain, 1995). A pesar de esto, no todas las células que sintetizan y secretan hormonas polipéptidas comparten su origen embrionario. Con ligeras diferencias entre especies, las células de la superficie del tubo neural, migran a lo largo de rutas estereotipadas y se diferencian para formar una variedad de tipos celulares, incluyendo entre otros: CC extra-adrenales, CC intra-adrenales (feocromocitos), CC granulares pequeñas, células paraganglionares extra-adrenales y células ganglionares autónomas (linaje simpatoadrenal) (Díaz-Flores et al. 2008; Kobayashi y Coupland, 1993).

Se ha hipotetizado que las CC y las neuronas simpáticas comparten células progenitoras simpatoadrenales en común, las cuales se agregan a la aorta dorsal (el tronco

derivado de células de la cresta neural), donde adquieren un destino de neuronas catecolaminérgicas. La señalización por la pared de la aorta dorsal provee varios factores como la proteína morfogenética de hueso (BMP, por sus siglas en inglés), y una variedad de factores de transcripción en una red de regulación cruzada (Díaz-Flores et al. 2008; Huber et al. 2002; Huber et al. 2005). Esta red incluye al factor de transcripción hélice-horquilla-hélice MASH-1, las proteínas de homodominio pareado Phox2a y Phox2b, Hand2; y la proteína de tipo dedo de zinc GATA 2/3, estos factores regulan la señalización de BMP (Díaz-Flores et al. 2008; Huber 2006; Huber et al. 2005; Moriguchi et al 2006).

En el ganglio simpático primario de embriones de pollo, la expresión de CASH-1 (el homólogo en el pollo de MASH-1) y Phox2b es seguida por la de Hand2, Phox2a y GATA2. El orden de aparición de CASH-1 y Phox2b no ha sido evaluado. Aunque se ha revelado que MASH-1 y su homólogo CASH-1 son expresados transitoriamente en toda la progenie autónoma de la cresta neural: neuronas simpáticas, parasimpáticas y entéricas; CC adrenales, así como en subconjuntos específicos de neuronas centrales (Huber et al. 2002; Huber et al. 2006). MASH-1 activa Phox2a, siendo un regulador positivo de los rasgos noradrenérgicos requerido para la adquisición de enzimas sintetizadoras de NA; TH y dopamina β-hidroxilasa (DBH). Además, algunos de los marcadores neuronales como SCG10 y periferina, son ausentes en células simpatoadrenales siguiendo una inactivación por MASH-1. La expresión de marcadores tempranos como: Phox2b, Hand2, c-Reet, neurofilamento 68 y 160, y tubulina específica de neuronas; no se ve afectada (Huber, 2006; Huber et al. 2002).

En ausencia de MASH-1 el desarrollo del sistema nervioso autónomo es casi eliminada por completo. Sin embargo, los ganglios simpáticos primarios se ensamblan normalmente en la aorta dorsal, y las células forman partes de su programa de

diferenciación normal, después eventualmente mueren (Huber 2006). Las células migran entonces en una dirección dorso-lateral para formar ganglios simpáticos o en dirección ventral para colonizar la glándula adrenal, donde pierden características de neuronas y se diferencian en CC (Díaz-Flores et al. 2008; Huber et al. 2002; Huber 2006). Las células simpatoadrenales que adoptan un destino final de CC endócrinas, además, regulan a la baja la expresión de marcadores neuronales (Kalcheim et al. 2002).

En el primordio de la glándula adrenal, diversas células neuroblásticas migratorias y fibras nerviosas penetran entre las células corticales. Estas células neuroblásticas entrantes, originan cordones de feocromoblastos (precursores de feocromocitos) en varios estados de diferenciación. En un principio las células corticales y los feocromoblastos, incluyendo aquellos que son funcionalmente activos y que contienen catecolaminas y neuropéptidos permanecen interrelacionadas hasta el periodo fetal (Díaz-Flores et al. 2008). Algunas células de la corteza suprarrenal se entrelazan con células medulares, mostrando células corticales localizadas dentro de la médula y viceversa. Esto ha sugerido, la comunicación directa (comunicación paracrina), y a través del sistema de circulación portal establecido por los vasos que irrigan primero a la corteza y posteriormente a la medula suprarrenal (comunicación endócrina) (Murakami et al. 1989).

Se ha sugerido la participación de glucocorticoides (corticoesteroides) y otros factores de la corteza en la diferenciación de las CC (Murakami et al. 1989), ya que en el desarrollo antenatal y postnatal del organismo se requieren glucocorticoides en cantidades mayores a las producidas por la corteza fetal (Sokolov et al 2006), además, las CC en cultivo pierden ciertas características de diferenciación por la ausencia de glucocorticoides, reflejándose generalmente en la falta de expresión de la feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT, por sus siglas en inglés), enzima necesaria para producir A partir de

NA; así como la ausencia de vesículas grandes de almacenaje de catecolaminas (LCDV) (Doupe et al 1985; Murakami et al 1989). No obstante, este efecto puede revertirse con la adición de corticosteroides al medio, logrando que estas características se mantengan, independientemente de la edad de las células (Doupe et al. 1985).

Se creía que los glucocorticoides participan en la correcta migración de los progenitores de células adrenales simpáticas (Gut et al.2006), sin embargo, varios autores han sugerido que neuronas y CC pudieran estar relacionados más distantemente que lo que se pensaba con anterioridad (Huber 2006; Kalcheim et al. 2002; Unsicker et al. 2005). La heterogeneidad de las células simpatoadrenales previa a la invasión adrenal se ha puesto de manifiesto, sugiriendo que las CC y las neuronas simpáticas se desarrollan independientemente de la cresta neural (Díaz- Flores et al. 2008; Huber 2006). La participación de los glucocorticoides puede estar relegada, sólo para la inducción de la PNMT (Huber et al. 2002; Kalcheim et al. 2002; Unsicker et al 2005). El papel de los glucocorticoides es imprescindible en esta inducción y casi exclusivo de las CC de la médula adrenal (Moro et al. 1990). Se ha observado en estudios con ratones carentes de receptores a hormonas glucocorticoides, que es posible revelar el fenotipo de CC, desarrollándose normalmente, pero con falta de la expresión de la PNMT, aunque con caracteres finales de CC adrenérgicas (Unsicker et al. 2005).

En cultivo de ratas neonatas, la ausencia de glucocorticoides ha sido sustituida por factores de crecimiento neural (NGF por sus siglas en inglés) y se ha observado que algunas células presentan elongaciones neuríticas y otras características morfológicas de neuronas (Doupe et al. 1985), revelando la relación ontogénica aunque esta, en etapas más tempranas del desarrollo. Otros factores de crecimiento liberados por fibroblastos, pueden

ser agentes que modifican la diferenciación y modulación del fenotipo neuronal de las CC medulares (Koval et al., 2000).

Se han reconocido diversas condiciones microambientales, como la presencia de células del sistema inmune, que pueden estar mediando la secreción de A y de NA; se sabe que existen macrófagos en todas las zonas de la glándula adrenal y se cree que cumplen un papel importante en la modulación de las respuestas adrenales (Koval et al., 2000; Díaz-Flores et al. 2008). Además, otros factores físicos pueden influir sobre la diferenciación y la expresión fenotípica, por ejemplo, se puede inducir crecimiento neurítico en CC en cultivo, por medio de la estimulación por campos magnéticos de baja frecuencia (entre 7 y 10 Hz) (Hernández-Hernández et al. 2009), la estimulación por campos magnéticos de baja frecuencia produce crecimiento neurítico en CC en cultivo en una forma similar a la exposición a NGF (Drucker-Colín et al 1994; Hernández-Hernández et al. 2009; Verdugo-Díaz et al. 2002). Se requiere estudiar a los genes involucrados en la diferenciación a escalas específicas espacio-temporales, además de estudios en fisiología evolutiva y sobre el desarrollo embrionario de estos tipos celulares.

#### **1.4 Las Catecolaminas**

Una vez diferenciadas por completo e incluso antes del término del desarrollo embrionario las CC secretan catecolaminas como principales productos metabólicos (Díaz-Flores et al. 2008). Las catecolaminas forman parte de las aminas biogénicas, que constituyen una clase de neurotransmisores que actúan a través de segundos mensajeros para producir una lenta transmisión sináptica (Randall et al. 1997)

La regulación de la liberación de catecolaminas por la médula adrenal comprende mecanismos que involucran al cerebro, la médula espinal, las sinapsis colinérgicas formadas por las terminaciones espláncnicas que inervan CC y por los receptores

colinérgicos postsinápticos en las membranas de CC adrenales medulares (García et al. 2006; Kobayashi y Coupland, 1993).

Las principales catecolaminas son A, NA y dopamina. En 1953, Udenfriend y colaboradores observaron que el grado de formación y de secreción normal de A por la glándula suprarrenal es extremadamente bajo. Realizaron un protocolo para eliminar la A de las glándulas suprarrenales de ratas y vieron que alrededor de la mitad de esta, se restablecía después de 72 hrs. No encontraron cantidades medibles de NA y sugieren que las vías de activación/inactivación para A y NA son muy distintas (Udenfriend et al. 1953).

#### **1.4.1 Síntesis y efecto biológico**

La L-tirosina, aminoácido incorporado en la dieta, circula en la sangre a una concentración de 1 a 1.5 mg/dl en el humano es capturado e introducido a las células mediante un transportador (Verdugo-Díaz, 2005). La L-tirosina, es el precursor para la síntesis de estos productos de las CC cuya síntesis comprende 4 reacciones secuenciales; a partir de ella se produce una reacción catalizada por la tirosina hidroxilasa (TH), la cual es el principal enzima limitante para la síntesis de catecolaminas (Nankova y Sabban, 1999). En esta reacción se forma la L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA); posteriormente la L-DOPA descarboxilasa (enzima no específica de L-DOPA, ya que también descarboxila a 5-hidroxi-L-triptofano) convierte a la L-DOPA en L-3,4-dihidroxifeniletilamina (dopamina), reacción que requiere piridoxal fosfato (vitamina B6) como cofactor; la dopamina será hidroxilada luego por la acción de la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa para formar la NA, y en esta reacción es necesaria la vitamina C como cofactor; y por último, la N-metilación de la NA por la PNMT da lugar a la formación de A mediante la incorporación de un grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina. (Udenfriend, Wyngaarden 1956; Axelrod, 1962; Verdugo-Díaz, 2005) (Figura 1.2).

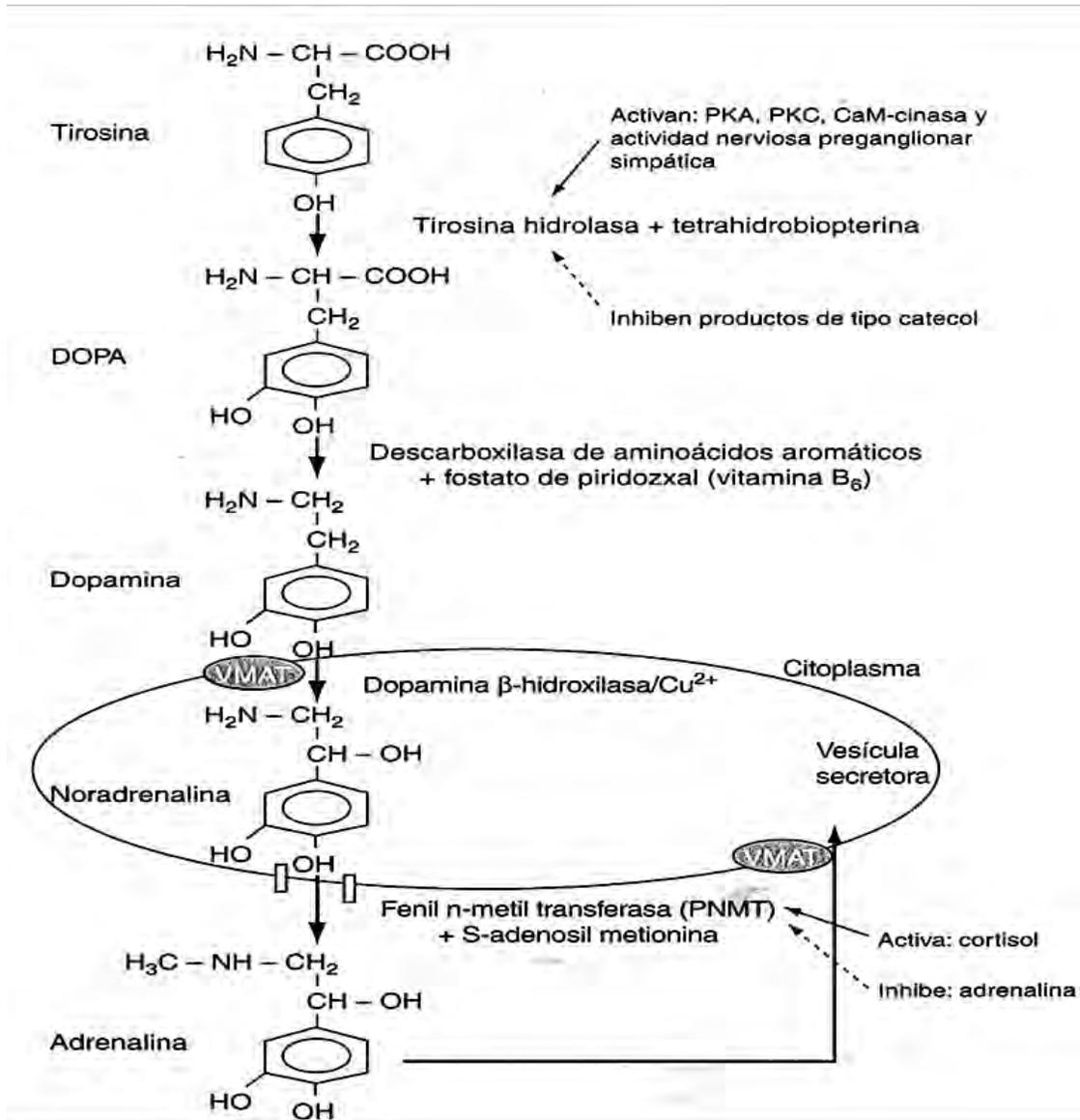


Figura 1.2. Biosíntesis de catecolaminas a partir de L-tirosina (modificado de Verdugo D. L. en Drucker R. 2005).

La metilación de NA a partir de A fue demostrada en un principio en extractos de glándula adrenal y adenosin trifosfato, posteriormente se mostro que el grupo metilo de la metionina es incorporado a la A, y más específicamente la *S*-adenosilmetionina fue mostrado como el donador en la *N*-metilación de la NA a A por Axelrod en 1962.

La inervación del esplácnico sobre la médula adrenal, libera una variedad de neurotransmisores que estimulan genes involucrados en la biosíntesis de catecolaminas a través de receptores muscarínicos y nicotínicos (Wong et al. 2002).

#### **1.4.2 Secreción de catecolaminas y otros productos metabólicos**

Además de las catecolaminas A, NA y dopamina; las vesículas secretoras de núcleo denso de las CC (LDCV), contienen proteínas cromograninas de matriz granular (secretogranina A, B o I, secretogranina C o II), neuropéptido-encefalinas, nucleótidos de adenina, calcio, syntaxina 1A, sinaptotagmina I y activador plasminogeno. También expresan adrenomedulina, péptido N- terminal 20 de proadrenomedulina y enzimas como la DBH y TH (Díaz-Flores et al, 2008).

Las catecolaminas tienen diversos blancos en el organismo y pueden participar como efectores inversos dependiendo del tipo de receptor a que se unen (Díaz-Flores et al. 2008; Randall et al. 1997; Verdugo-Díaz 2005).

A y NA, se unen a receptores adrenérgicos (adrenoreceptores), localizados en las membranas celulares, y activan un número de segundos mensajeros intracelulares, lo que permite una respuesta tejido-específica. Se reconocen dos principales tipos de receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ , que difieren principalmente en su sensibilidad a las aminas simpáticas. Se han caracterizado distintos subtipos de receptores  $\alpha$  y  $\beta$  en base a su habilidad para bloquear o promover la actividad del receptor (Randall et al. 1997; Verdugo-Díaz et al. 2005) (cuadro 1).

Órgano blanco	Tejido o sistema	Receptor	Respuesta
Corazón	Nodo senoauricular	$\beta_1$	Taquicardia
	Sistema de conducción		Aumento en la velocidad de conducción (puede causar arritmias)
	Ventriculos		Aumento en la contractilidad y la velocidad de conducción
Arteriolas	Coronaria	$\alpha_1$	Vasoconstricción (*)
	Músculo esquelético	$\alpha_1$	Vasoconstricción (*)
		$\beta_2$	Vasodilatación (*)
	Cerebrales	$\alpha_1$	Ligera vasoconstricción.
	Del área esplácnica (gastrointestinales y renales)	$\alpha_1$	Vasoconstricción
	Piel y mucosas	$\alpha_1$	Vasoconstricción (palidez)
Venas		$\alpha_1$	Vasoconstricción (permite aumentar el retorno venoso)
Pulmón	Músculo bronquial	$\beta_2$	Broncodilatación
Metabolismo	Músculo	$\beta_2$	Estimula la glucogenólisis e inhibe la síntesis de glucógeno.
	Hígado	$\beta_2$	Estimula la glucogenólisis, la gluconeogénesis e inhibe la síntesis de glucógeno
	Adipocitos	$\beta_3$	Lipólisis
Islotes pancreáticos	Células $\beta$	$\alpha_2$	Inhibe la secreción de insulina
		$\beta_2$	Estimula la secreción de insulina
	Células $\alpha$		
		$\beta_2$	Estimula la secreción de glucagón
Tracto intestinal	Músculos	$\alpha_1, \alpha_2$	Disminuye la motilidad
	Células secretoras	$\alpha_2$	Inhibe la secreción de jugos digestivos
Glándulas salivales		$\beta_1$	Estimula la secreción de moco
Piel	Glándulas sudoríferas	$\alpha_1$	Sudoración adrenérgica en ciertas regiones
	Músculo pilomotor	$\alpha_1$	Piloerección
Ojo	Músculo dilatador de la pupila	$\alpha_1$	Miđriasis (dilatación pupilar)
	Músculo ciliar	$\beta_2$	Relajación para visión lejana
	Humor acuoso	$\beta_2$	Aumenta la producción activa en el cuerpo ciliar.
Órganos sexuales masculinos		$\alpha_1$	Eyacuación
Útero		$\beta_2$	Relajación en útero preñado y no preñado
		$\alpha_1$	Contracción en útero preñado

Cuadro 1 Efectos de las catecolaminas sobre los distintos receptores adrenérgicos en diferentes células blanco de diferentes tejidos (modificado de Verdugo D. L. en Drucker R. 2005).

La estimulación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos puede ocasionar una disminución en los niveles de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) a través de su unión con proteínas G inhibitorias ( $G_i$ ) e inducir la vía del inositol de fosfolípidos (IP's), ocasionando la liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios intracelulares; o pueden activar canales de  $Ca^{2+}$  asociados a la membrana plasmática, y en consecuencia provocar un influjo de  $Ca^{2+}$

extracelular a la célula. La estimulación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos usualmente es acoplada, a través de la vía de proteínas G estimuladoras ( $G_s$ ), incrementando los niveles de cAMP. Las catecolaminas afectan la contracción del músculo liso, inducen la vasoconstricción, y estimulan la glicólisis y lipólisis (Randall et al. 1997).

NA y A, pueden encontrarse circulando libres en plasma o como conjugados con sulfato o glucoronida, mucha de la A circulante está unida a proteínas plasmáticas, especialmente albúmina. La NA se une menos que la A, así como pequeñas cantidades de dopamina pueden ser liberadas (Norris 1996).

Las catecolaminas circulantes tienen una vida media biológica corta y son rápidamente excretadas a través de la orina tanto en formas libres como conjugadas. Son inactivadas en diversas maneras. En las neuronas productoras de NA, por ejemplo, esta puede ser recapturada en el citoplasma de la neurona presináptica, donde puede ser re-almacenada en vesículas sinápticas para su nueva liberación. La vida media de la A es aproximadamente de 5 min (Verdugo-Díaz, 2005).

La vía metabólica más común para la inactivación de las catecolaminas involucra a la monoamino-oxidasa (MAO), localizada en la membrana externa de la mitocondria; y extracelularmente por la catecolamina-*O*-metil transferasa (COMT), presentes principalmente en el hígado y riñones, produciendo metabolitos inactivos que aparecen en la orina. Los metabolitos urinarios más comunes son el ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico, por la degradación de metanefrina y la normetanefrina por acción de la MAO (Randall et al. 1997) (figura 1.3).

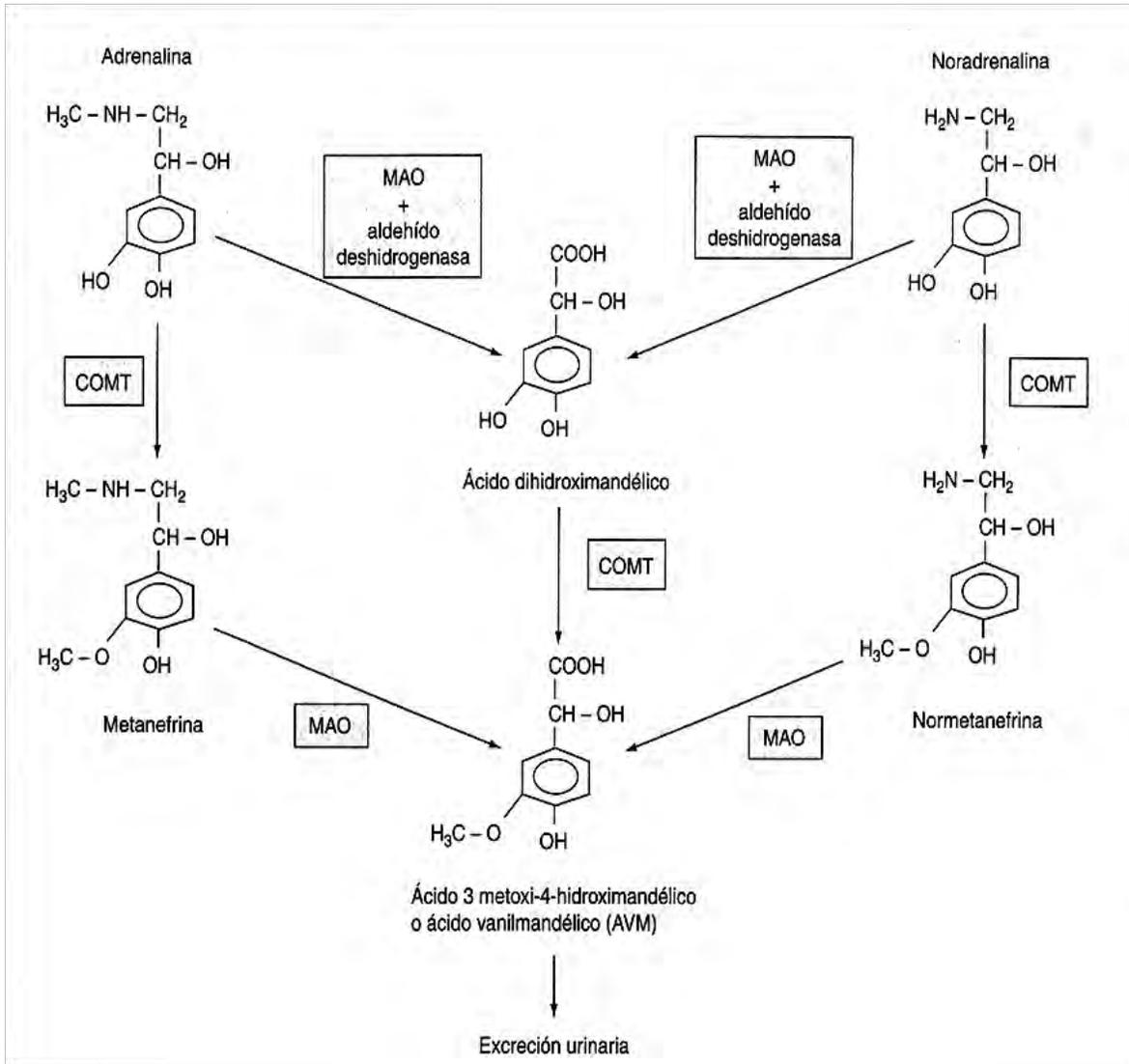


Figura 3. Vías de degradación de las catecolaminas (modificado de Verdugo D. L. en Drucker R. 2005).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Mecanismos de activación de las Células Cromafines

Los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) libre, regulan la activación y control de una gran cantidad de procesos celulares, incluyendo la excitabilidad, el desarrollo celular y la secreción; por tanto, el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  puede ser considerado una medida indirecta de la activación celular y ha sido utilizado para medir, entre otros; los efectos de la estimulación mecánica, térmica y química en células excitables (Duflo et al. 2004; García et al. 2006). Los mecanismos operados en las CC, incluyen actividad eléctrica, una diversidad de canales de calcio, vías de señalización internas y la participación de la organela intracelular. Logrando una regulación fina de la secreción en las CC (Dunlap et al. 1995).

La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es regulada por la interacción de procesos opuestos que pueden dividirse en procesos de ‘encendido’ y ‘apagado’ dependiendo de cómo pueden servir para incrementar o disminuir el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Bootman et al. 2001). El mecanismo de encendido, incluye canales localizados en la membrana plasmática que regulan el suministro de  $\text{Ca}^{2+}$  del espacio extracelular, además de canales del retículo endoplásmico y otros organelos que participan como reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Un mecanismo igualmente diverso opera el apagado, removiendo el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma, secuestrándolo o almacenándolo (Bootman et al. 2001; Miranda-Ferreira et al. 2009).

Las diferencias en las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y en consecuencia la secreción por exocitosis, se presenta entonces en respuesta a la administración de distintos estímulos como lo es la unión del agonista acetilcolina (ACh) liberada por terminales presinápticas, mediante la estimulación del nervio esplácnico (Kobayashi y Coupland, 1993; Akiyama et al. 2004). Existen diferencias que se han reconocido en animales bajo diversas condiciones,

mostrando que la secreción responde a demandas propias del organismo, por lo que es diferente dentro y entre los grupos de vertebrados. Por ejemplo, Edwards y colaboradores (1980) mostraron la diferencia en la cantidad de A y NA secretada en becerros conscientes en relación a becerros anestesiados. La A fue liberada en mayor medida en respuesta a hipoglicemia o hipoxia en becerros conscientes. En contraste, más NA que A es liberada en respuesta a otros estímulos; incluyendo la estimulación del nervio esplácnico, la aplicación de Ach intra-arterial o la asfixia en becerros anestesiados (Edwards et al. 1980).

Edwards y colaboradores (1996), han sugerido que existe una inervación diferencial selectiva de células productoras de A (adrenérgicas) y de NA (noradrenérgicas) en la médula adrenal, y en su trabajo mediante marcadores inmunohistoquímicos en neuronas preganglionares adrenales de gato, mostraron que distintos segmentos de la médula espinal inervan poblaciones adrenérgicas o noradrenérgicas; esta secreción diferencial puede responder a distintas condiciones de estrés; y su regulación específica esta mediada por núcleos del SNC localizados en la corteza, el hipotálamo y la médula espinal (Edwards et al. 1996; Nassar-Gentina et al 1988).

La estimulación por medio del nervio esplácnico, genera además de las respuestas adrenales, diversas respuestas cardiovasculares (Edwards 1982; Edwards et al. 1980; Jansen et al. 1995). Las CC medulares responden a la ACh, induciendo despolarizaciones transitorias de la membrana plasmática de las CC (Kobayashi y Coupland, 1993). En algunos animales esto es debido a la apertura de un tipo de canales-receptores nicotínicos tipo neuronales (nAChR -*nicotinic acetylcholine receptors*-) y muscarínicos (mAChR -*muscarinic acetylcholine receptors*-) presentes en las CC (Nassar-Gentina et al. 1988). Los patrones de disparo de los nervios esplácnicos hacia receptores nicotínicos y muscarínicos, podrían ocasionar la liberación selectiva de A o NA (Edwards et al. 1996).

## 2.2 Actividad eléctrica en células cromafines

Las propiedades eléctricas de las CC han sido ampliamente documentadas en distintos estudios en humanos y en modelos animales como gerbiles (Biales et al 1976), ratas (Brandt et al. 1976) y ratones (Nassar-Gentina et al. 1988).

Gracias al desarrollo de técnicas para el registro electrofisiológico como lo es el pinzamiento de membrana en sus distintas modalidades, ha sido posible identificar la corriente generada a través de la membrana plasmática y conocer sus componentes (García et al. 2006). La actividad eléctrica puede presentarse espontáneamente o inducida (Brandt et al. 1976; Edwards et al. 1980; Nassar-Gentina et al. 1988), generando potenciales de acción (PA) similares a los de neuronas simpáticas (Biales et al. 1976; Brandt et al. 1976). La distribución selectiva de iones en la membrana plasmática, origina en ella diferencias en la distribución de cargas eléctricas, lo que permite a las células generar este tipo de actividad (Biales et al. 1976).

El potencial de reposo (PR) en las CC, como en otras células excitables, puede modificarse por los iones disueltos en las soluciones extracelulares, por ejemplo, en solución salina estándar conteniendo 10 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  Brandt y colaboradores (1976) registraron un PR en ratas de  $-49 \pm 6$  mV, mientras que en solución libre de sodio ( $\text{Na}^+$ ) fue de  $-63 \pm 9$  mV, ellos observaron que los PA en las CC tienen un componente de  $\text{Na}^+$  y otro de  $\text{Ca}^{2+}$  y que los PA se presentan en un rango de 0.05-0.1/s. Biales y colaboradores, (1976) en registros en CC de Gerbiles, encontraron un PR en un rango de -50 mV a -70 mV, y que estas CC generaban PA, con el  $\text{Na}^+$  como principal componente, dichos estudios fueron realizados en CC en cultivo.

Las CC *in situ* tienen un potencial de membrana en reposo de  $-54.3 \pm 8$  mV dependiendo de la  $[\text{K}^+]$  extracelular, que corresponde a lo predicho por la ecuación de

campo constante. Existe una diferencia en la resistencia de la membrana entre CC aisladas la cual es de alrededor de  $5G\Omega$ , respecto a CC *in situ* donde esta es menor por más de un orden de magnitud ( $\sim M\Omega$ 's). Tal diferencia, puede deberse a que las CC en el tejido intacto están acopladas eléctricamente. El 50% de estas células *in situ* muestra actividad eléctrica espontánea (Nassar-Gentina et al. 1988).

En un principio, las corrientes de  $Ca^{2+}$  fueron difíciles de reconocer, y se vio que estas eran independientes de las corrientes de potasio ( $K^+$ ). La amplitud de la corriente unitaria de  $Ca^+$  es lenta y las variaciones en el  $Ca^{2+}$  intracelular pueden alterar incluso, la conductancia propia de este ión (modulación de  $Ca^{2+}$  por  $Ca^{2+}$ ) (Artalejo et al. 1990; Fenwick et al. 1982a; 1982b, García et al. 2006).

### **2.2.1 Mecanismo de facilitación y activación colinérgica en células cromafines**

Los PA en las CC pueden generarse en respuesta a pulsos de corriente pre-despolarizantes y despolarizantes repetitivos, lo cual se ha estudiado dentro de rangos fisiológicos, este mecanismo ha sido reconocido como facilitación por canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (Artalejo et al. 1990; Nassar-Gentina et al. 1988). Se ha observado que a bajas concentraciones de ACh ( $10\mu M$ ), pero posterior a una rápida despolarización por la activación de canales de  $Na^+$ , se presenta la apertura de canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática (Nassar-Gentina et al. 1988).

Los PA son dependientes de sistemas permeables de voltaje de  $Na^+$  y de  $Ca^{2+}$  y el bloqueo de los canales de  $Na^+$  por tetrodotoxina (TTX) resulta en una inhibición parcial en la liberación de catecolaminas (Biales et al. 1976), esto ha sido verificado en otros estudios en bovinos y ratones (Fenwick et al. 1982a; Nassar-Gentina et al. 1988). Se propone que esta inhibición parcial de la liberación de catecolaminas al aplicar TTX, puede deberse a la

disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  asociada a la despolarización provocada por ACh (Nassar-Gentina et al. 1988).

La despolarización de la membrana de CC inducida por la aplicación iontoforética ACh está frecuentemente acompañada por la generación de PA o por un marcado aumento en la frecuencia de PA espontáneos (Biales et al. 1976; Brandt et al. 1976; Edwards y Jones 1993; Nassar-Gentina et al. 1988), este efecto puede ser bloqueado por atropina (antagonista colinérgico muscarínico), pero no por D-tubocurarina (bloqueador de los nACh), sugiriendo que la estimulación por ACh de las CC en el ratón involucra la activación de los mACh (Fenwick et al. 1982a).

Se ha propuesto que mientras la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los nACh está restringida a una pequeña región de la membrana; los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje están probablemente distribuidos de manera uniforme sobre toda la superficie de la membrana como se ha observado mediante diversos estudios electrofisiológicos (Nassar-Gentina et al. 1988), aunque recientemente, se ha sugerido que la distribución de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana células en tejido intacto, difiere de lo que se presenta en el células en cultivo. Y pudiera encontrarse una distribución selectiva de dichos canales en el tejido *in situ*, esto se ha sugerido por que el tratamiento que reciben las células en cultivo podría desencadenar una modificación en la expresión de los canales en la membrana plasmática (García et al. 2006; Santana et al. 1999).

Los nACh, son ensamblajes pentaméricos de subunidades  $\alpha 3$  y  $\beta 4$  que forman canales iónicos los cuales producen despolarizaciones en la membrana por el incremento en la permeabilidad de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Sala et al. 2008). Parte del  $\text{Ca}^{2+}$  puede entrar a las células a través de nACh, pero se sugiere que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje puede jugar un mayor papel en la regulación de los niveles

intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la secreción catecolaminérgica (Artalejo et al. 1991). Este tipo de receptores no sólo está relacionado con la transmisión colinérgica en el sistema simpático, sino también poseen características adaptativas importantes que compensan la señalización en intervalos a corto y largo plazo durante el acople persistente de un agonista, por lo que son un modelo importante en la exploración de las características básicas de la plasticidad por neurotransmisión (Sala et al. 2008).

Artalejo y colaboradores (1991) mostraron dos componentes en la corriente total de CC y sugieren que la facilitación es debida al reclutamiento selectivo de un tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a las 1,4-dihidropiridinas (DHP), estos canales han sido reconocidos como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Se ha observado una gran variedad de efectos debidos a la activación de receptores muscarínicos por la ACh, como lo es la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales catiónicos no selectivos y de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, así como el impedimento y/o aumento de disparos de PA; además, de su naturaleza de actividad de larga duración, sugiere que los mAChr deben contribuir al control fino de la respuesta secretora sobre la estimulación preganglionar simpática en periodos prolongados de tiempo (Olivos y Artalejo, 2008). Mientras que los nAChr aseguran una rápida y eficiente transmisión de impulsos preganglionares, los mAChr juegan un papel subsidiario principalmente facilitando la respuesta nicotínica (Olivos y Artalejo, 2008).

La liberación de catecolaminas inducida por ACh en las CC de ratón principalmente depende de los mAChr, que regulan la despolarización de la membrana celular e incrementan los disparos de PA (Nassar-Gentina et al. 1988; Olivos y Artalejo, 2008).

### **2.3 Los canales de calcio**

Existe una extensa diversidad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  con características en la activación, cinética y farmacología; lo que permite a las CC reaccionar ante estímulos y condiciones específicas con respuestas finamente controladas. Se han realizado trabajos para reconocer las estructuras de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y la complejidad estructural en estos canales, sugiere una especialización funcional (Dunlap et al. 1995). Bajo condiciones iónicas fisiológicas, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  exhiben una selectividad casi perfecta por el  $\text{Ca}^{2+}$  sobre el  $\text{Na}^+$ , aunque el  $\text{Na}^+$  se encuentra en la solución extracelular más de 50 veces la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $150 \text{ mmolL}^{-1}$  de  $\text{Na}^+$  contra  $2 \text{ mmolL}^{-1}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Bean 2001). Una pista importante en el mecanismo de selectividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  surge de la observación de que si todos los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  son removidos, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se vuelven altamente permeables al  $\text{Na}^+$ , estas corrientes pueden ser bloqueadas por concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugiriendo que existe una alta afinidad del sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del poro (Bean, 2001).

### **2.3.1 Canales de calcio activados por unión de ligando**

Además de la activación colinérgica, existen canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en las CC que pueden activarse por la unión de diversos ligandos. El aislamiento, purificación y síntesis de diferentes neurotoxinas ha mostrado que existen ligandos con una notable discriminación por los diferentes subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (García et al. 2006).

Por ejemplo, la activación de un tipo de receptores de dopamina (D1), acoplados a la adenilato ciclasa causan el reclutamiento de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a DHP, pero no de los canales resistentes a DHP, esta facilitación de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$  por el reclutamiento de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (canales de alto umbral de activación), muestra un aumento en la liberación de catecolaminas, y ha sido reconocido en estudios sobre la exocitosis, a través de mediciones en la capacitancia de la membrana (Artalejo et al 1991; Albillos et al, 1996).

La unión de varias hormonas o factores de crecimiento a receptores específicos en la membrana plasmática, al igual que la unión de ACh, induce la activación de la fosfolipasa C (PLC) la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) para producir los mensajeros intracelulares inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (Donald et al. 2002). Esta activación se produce por un número de receptores acoplados a proteínas G, entre los que se encuentran la histamina y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) con un gran efecto, y en menor medida: la angiotensina II, bradiquinina, el adenosin trifosfato (ATP) y las prostaglandinas (Donald et al. 2002). Otro efector de las CC por receptores acoplados a proteínas G son las orexinas, los cuales son péptidos excitatorios (Huang et al. 2008).

El IP<sub>3</sub> es muy móvil en el citoplasma y se difunde en el interior celular donde existen receptores específicos a IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R's) que en consecuencia realizaran la apertura de canales de Ca<sup>2+</sup> de reservorios como el retículo endoplásmico, logrando altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup>. Aunque los IP<sub>3</sub>R requieren del IP<sub>3</sub> para la apertura del poro, su activación es regulada por la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, la apertura de los IP<sub>3</sub>R aumenta por el modesto incremento en el Ca<sup>2+</sup> (0.5 – 1μM), mientras altas [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (>1μM) inhiben su apertura, aunque se ha sugerido más recientemente, que no todas las isoformas de los IP<sub>3</sub>R se inhiben por el Ca<sup>2+</sup> citosólico, Un análogo a los IP<sub>3</sub>R son los receptores a rianodina (Bootman et al. 2001; Donald et al. 2002). El diacilglicerol producido por la PLC funciona como un mensajero intracelular al activar la proteína cinasa C (PKC), la cual está involucrada en el proceso de exocitosis y más precisamente en el transporte vesicular (García et al. 2006).

### **2.3.2 Activación de canales de calcio dependiente de calcio**

Existe una regulación inhibitoria dependiente de Ca<sup>2+</sup> por parte de diversos organelos intracelulares como la mitocondria, que juega un papel en la regulación de los

niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Hernández-Guijo et al. 2001). Estos organelos tienen una baja afinidad, pero alta capacidad como uniportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  y pueden significativamente reducir transitoriamente el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico disminuyendo la respuesta celular (Bootman et al. 2001; Hernández-Guijo et al, 2001).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por  $\text{Ca}^{2+}$  se activan en respuesta a la eliminación de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, tanto por movilizaciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ , como por agentes farmacológicos (Bootman et al. 2001). Aunque a grandes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , por ejemplo  $> 55 \mu\text{M}$ , se ha observado que también se presenta una entrada adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  la cual puede realizarse por medio los canales nicotínicos de ACh, siendo este un mecanismo en gran medida independiente de la concentración (García et al. 2006). El aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  origina la inhibición de canales tipo L, N y P/Q, esta señal parece ser regulada por una captura rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria (Hernández-Guijo et al. 2001; Miranda-Ferreira et al. 2009).

Por medio de la técnica de transcripción reversa por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), en CC se han identificado múltiples ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA) que codifican para subunidades formadoras de poros en canales de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronales ( $\alpha_{1A}$  canales tipo P/Q,  $\alpha_{1B}$  canales tipo N,  $\alpha_{1D}$  canales tipo L neuro/endócrino,  $\alpha_{1E}$  canales tipo R,  $\alpha_{1G-H}$  canales tipo T y  $\alpha_{1S}$  canales tipo L de músculo esquelético en CC bovinas) (Benavides et al. 2004; García-Palomero et al. 2000), estos canales muestran diferencias en su activación e inactivación, respondiendo al voltaje y al grado de polarización de la membrana, así como a una farmacología específica (Bean 2001; Benavides et al. 2004; García et al. 2006).

### **2.3.3 Canales de calcio dependientes de voltaje**

Los canales de  $Ca^{2+}$  operados por voltaje son empleados ampliamente por células excitables. Son complejos de macromoléculas que consisten en 4 o 5 proteínas, subunidades ( $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma, \delta$ ) donde  $\alpha_1$  participa como formadora del poro y las demás como reguladoras de la apertura del canal (Bean 2001; Bootman et al. 2001). La apertura dependiente de voltaje es debida a residuos de amino ácidos cargados positivamente en la cuarta región transmembranal (S4) de cada pseudosubunidad. Cuando el voltaje de la membrana es despolarizado, se cree que las cargas del segmento S4 modifican la conformación del canal y eventualmente este se abre (Bean 2001; Benavides et al. 2004).

Tipo de canal de calcio					
Nueva nomenclatura	Nomenclatura tradicional	Tipo de corriente	Bloqueadores	Activadores	Tejido
Cav 1.1	$\alpha_{1S}$	L	Nifedipina Nisoldipina Nitrendipina	BAY K 8644 FPL64176	Músculo esquelético
Cav 1.2	$\alpha_{1C}$	L	Nifedipina Nisoldipina Nitrendipina	BAY K 8644 FPL64176 PCA50941	Corazón Músculo liso <b>Médula adrenal</b> Cerebro pituitaria
Cav 1.3	$\alpha_{1D}$	L	Nifedipina	BAY K 8644 FPL64176	Cerebro Pancreas <b>Médula adrenal</b> Riñón Retina Ovario Coclea Retina
Cav 1.4	$\alpha_{1F}$	L	Nifedipina	BAY K 8644 FPL64176	Cerebrolo Pituitaria Coclea <b>Médula adrenal</b>
Cav 2.1	$\alpha_{1A}$	P/Q	$\omega$ -Aga-IVA $\omega$ -Ctx-MVIIC $\omega$ -Ctx-MVIID		Cerebro SNP <b>Médula adrenal</b>
Cav 2.2	$\alpha_{1B}$	N	$\omega$ -Ctx-GVIA $\omega$ -Ctx-MVIIA		Cerebro Coclea Retina Corazón Pituitaria <b>Médula adrenal</b>
Cav 2.3	$\alpha_{1E}$	R	SNX-482		Cerebro SNP Corazón <b>Médula adrenal</b>
Cav 3.1	$\alpha_{1G}$	T	Mibefradil		Corazón Cerebro Riñón Hígado Glomerulosa adrenal <b>Médula adrenal</b>
Cav 3.2	$\alpha_{1H}$	T			Cerebro
Cav 3.3	$\alpha_{1I}$	T			

Cuadro 2. Subtipos de canales de calcio de acuerdo al tipo de subunidad  $\alpha_1$  que presentan.  $\omega$ -Aga,  $\omega$ -agatoxina,  $\omega$ -Ctx,  $\omega$ -conotoxina (modificado de García et al. 2006).

Los canales que requieren pequeñas despolarizaciones son llamados canales de bajo umbral o activados por bajo voltaje (LVA, *low-voltage activated*), también conocidos como canales tipo T (*tiny*), debido a que generalmente acarrear corrientes que son transitorias y pequeñas. Su inactivación es rápida típicamente en unos cuantos milisegundos y se genera a PR de -60 a -50 mV. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T además de su bajo umbral de activación, se caracterizan por tener una permeabilidad similar al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{Ba}^{2+}$ , y de ser más sensibles al bloqueo por níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) que por cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ). Pueden ser bloqueados por *l*-octanol, amilorida, y mibefradil (Benavides et al. 2004; García et al. 2006).

Los canales que requieren despolarizaciones mayores son llamados de alto umbral o canales activados por alto voltaje (HVA *high-voltage activated*), los canales tipo L (de *long-lasting*) presentan una pequeña inactivación durante pasos despolarizantes (T inactivación > 500 ms) y una baja sensibilidad a potenciales de reposo despolarizantes (Bean B. P., 2001; García et al. 2006). Estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  son sensibles a las DHP como se ha mencionado, por medio de agonistas como BAY K 8644, o por antagonistas como la nifedipina, nitrendipina y nisoldipina entre otros. (García et al. 2006; Hernández-Guijo et al. 1999).

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N se inactivan más rápido que los canales tipo L, y no persisten a PA menores. Son bloqueados irreversiblemente por la toxina de *Conus geographus*  $\omega$ -conotoxina G VIA y reversiblemente por la toxina de *Conus magus*  $\omega$ -conotoxina M VIIA. Otras toxinas de amplio espectro como  $\omega$ -conotoxina M VIIC y  $\omega$ -conotoxina M VIID pueden bloquearlos de una forma no selectiva (Benavides et al. 2004; García et al. 2006; Hernández-Guijo et al. 2001).

Existen canales relativamente insensibles a los cambios en el PR y que no se inactivan durante los pasos despolarizantes, estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo P, son bloqueados por la toxina de *Agelenopsis aperta* (FTX). Farmacológicamente se ha descrito un tipo de canal muy relacionado con los canales tipo P, estos son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo Q, los cuales son sensibles a la toxina del caracol marino *Conus magus* ( $\omega$ -conotoxina M VIIC), son resistentes al bloqueo por DHP. El componente P/Q de la corriente de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , es inactivado por voltaje (Chan et al. 2005; García et al. 2006; Hernández-Guijo et al. 2001).

Utilizando la técnica de pinzamiento de membrana en la configuración de parche-perforado en lugar de la configuración de célula completa, se ha encontrado otro componente de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  en rebanadas de la médula adrenal de ratón, corriente tipo R (García et al. 2006). En el cuadro 2 se muestra un resumen de los diferentes subtipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , su nomenclatura actual y anterior, así como los principales agonistas y antagonistas a que son sensibles, y los tejidos donde se localizan.

#### **2.4 Inactivación de los canales de calcio**

Existe una variedad de mecanismos para la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras la despolarización activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , una despolarización sostenida frecuentemente ocasiona que la corriente decline, este proceso es llamado inactivación. El curso temporal de la inactivación varía ampliamente entre los diferentes tipos de canales (Bean 2001).

Las CC liberan también, encefalinas, modestamente al péptido vaso intestinal (VIP), y en menor proporción al neuropéptido Y (NPY) y al péptido gastro-liberado (GRP). Estas diferencias se deben a un fuerte aumento de la inactivación y la eliminación del NPY

adrenal en respuesta a distintas condiciones, por ejemplo, la hipoglicemia (Edwards y Jones 1993).

Las membranas de las CC poseen receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ . Los opioides secretados pueden inhibir la secreción de catecolaminas inducida por nACh, ya que, las CC co-liberan péptidos opioides y catecolaminas, siguiendo la estimulación de los nACh. (Kim et al. 2006). Esta co-liberación está relacionada con un sistema de retro-alimentación negativa, por lo que ciertas respuestas a la estimulación de algunas vías nerviosas autónomas están sustancialmente potenciadas por un estímulo de alta frecuencia, mientras otras ni siquiera se ven afectadas (Bloom et al, 1988; Edwards y Jones 1993). La participación de ATP y péptidos opioides en la regulación de la actividad de las CC, ha sido estudiada en diversos trabajos (Hernández-Guijo et al. 2001; Hernández-Guijo et al. 1999; Kim et al. 2005; ).

## **2.5 Secreción y mecanismo de exocitosis**

La liberación de transmisores neuropéptidos es regulada después de la fusión vesicular con la superficie de la célula, la secreción diferencial de neuropéptidos y catecolamina obedece en gran medida al tamaño del poro formado con la fusión vesicular. Sólo bajo un elevado índice de disparos durante la respuesta simpática al estrés, las vesículas pueden colapsar por completo expeliendo catecolaminas y neuropéptidos (Fulop y Corey, 2006).

Los índices basales de disparo resultan en una liberación selectiva de catecolaminas a través de un evento de fusión ‘besa y corre’ en forma de  $\Omega$  caracterizado por un estrecho poro de fusión. Incrementando el índice de disparo y por ende los niveles de  $Ca^{2+}$  se activa a la proteína cinasa C, la cual promueve la dilatación del poro hasta el colapso de los

gránulos, ayudando a efectuar una respuesta al estrés agudo apropiada (Fulop y Smith, 2006).

El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  regula además, los primeros pasos en la vía secretora. El  $Ca^{2+}$  actúa sobre la fusión de vesículas de núcleo de gran densidad, lo cual se ha observado en CC de ratón en rebanadas adrenales. La  $[Ca^{2+}]_i$  basal regula la transferencia de vesículas hacia un estado de liberación lenta, mientras que una lejana maduración a un estado de fácil liberación es independiente de  $Ca^{2+}$ . Niveles altos de  $Ca^{2+}$  ( $3\mu M$  por ejemplo) provocan la exocitosis de todas las vesículas de pronta y lenta liberación en dos reacciones de fusión paralelas y cinéticamente distintas. Estos resultados sugieren que el  $Ca^{2+}$  actúa antes y después de la formación de un complejo proteínico *trans*-SNARE para regular la competencia y cinética de fusión de las LCDV (Voets, 2000).

Despolarizaciones breves del tipo PA llevan a la exocitosis en rebanadas adrenales de ratón. El índice de secreción obtenido por estudios en la capacitancia de la membrana en CC en rebanadas es más rápido que lo observado en células en cultivo. Esta exocitosis rápida es debida a la rápida liberación de unos pequeños pozos de vesículas. Estos pozos se recuperan de su vaciado con una constante en el orden de segundos. El reclutamiento de vesículas de liberación rápida se dificulta en presencia del quelador de  $Ca^{2+}$  BAPTA y un poco menos por el quelador de  $Ca^{2+}$  EGTA (Moser y Neher 1997). Se cree que las vesículas están localizadas en estrecha proximidad con los canales de  $Ca^{2+}$ . Y que el acople espacial de la entrada de  $Ca^{2+}$  y la exocitosis pueden ser sensibles al aislamiento de las células en cultivo (García et al. 2006; Moser y Neher, 1997; Voets 2000).

## **2.6 Uniones comunicantes**

Las uniones comunicantes (*Gap junctions* en inglés), son uniones que se forman por un poro por el cual logran pasar moléculas del citoplasma de una célula, al de otra, sin pasar por el espacio extracelular (Martin et al. 2001). Está compuesta por un conexón por membrana, el cual se forma por 6 conexinas generalmente. En las CC, un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  es un evento clave en la inducción de la exocitosis. Los PA o transitorios en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por los nAChr se han descrito en CC aisladas, sin embargo se ha dado poco detalle de cómo permanecen confinados a las células estimuladas o su propagación a células adyacentes. Martin y colaboradores (2001), mostraron mediante estudios electrofisiológicos por la técnica de pinzamiento de membrana, y por registros de imágenes confocales en tiempo real en rebanadas adrenales de rata; que existen transitorios de  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneos o inducidos en células vecinas. Sospechando que estas son debidas a la participación de comunicación electrotónica por medio de uniones comunicantes (Martin et al. 2001).

La estimulación nicotínica de una sola célula provoca la liberación de catecolaminas en células acopladas, lo que ha sido demostrado en la detección amperiométrica de eventos de secreción. El acople funcional entre CC *in situ* puede representar un complemento eficiente en la transmisión sináptica para amplificar la liberación de catecolaminas después de la estimulación de una sola CC (Martin et al. 2001).

Se ha observado en diversos estudios en rebanadas adrenales, que los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  de una célula son transmitidos a una o dos células adyacentes. Los cambios sincronizados en la  $[Ca^{2+}]_i$  entre dos células es mucho menos frecuente en ratas que en ratones. Los cambios espontáneos en la  $[Ca^{2+}]_i$  son también sincronizados entre células en estrecho contacto en cultivo. Esto sugiere que la difusión del  $Ca^{2+}$  es mediada por el acople intercelular de baja conductancia (Yamagami et al. 2002).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El comportamiento de las CC en el tejido intacto ha sido objeto de estudio en años recientes, inicialmente se utilizaban técnicas para el estudio del acople estímulo-secreción en la glándula completa en animales vivos.

Diversos estudios se han llevado a cabo posteriormente en CC en cultivo, donde se han reconocido una gran cantidad de mecanismos que operan en este tipo celular. Sin embargo, se ha observado que algunas características de estas células tan especializadas, se pierden bajo estas condiciones, características como la comunicación intercelular y condiciones microambientales, indispensables en el control fino de la secreción.

Existen diversos trazadores, ampliamente utilizados en el estudio de los mecanismos dependientes de  $Ca^{2+}_i$ . Gracias a ellos, se puede seguir la presencia de estos iones en el citosol, cuando el  $Ca^{2+}$  es liberado de los reservorios intracelulares o cuando entra por canales de la membrana. Las pruebas de fluorescencia como medida indirecta de la movilización de iones u otros elementos intracelulares han sido ampliamente utilizadas.

La observación de las diferencias en las variaciones en el  $Ca^{2+}$  en las CC en el tejido *in situ* en distintas regiones de las células; la difusión de ondas de  $Ca^{2+}$  y los patrones de oscilación del  $Ca^{2+}_i$  de células en conjunto o módulos. Nos permite entender de manera más precisa como es la fisiología de las CC.

Este estudio sobre las variaciones en el  $Ca^{2+}_i$  en el tejido intacto, está enfocado a aportar evidencia sobre la distribución de los canales de  $Ca^{2+}$  en distintas regiones de la célula y las relaciones temporales entre regiones de una misma célula y de células dispuestas en módulos en la médula adrenal.

#### 4. HIPÓTESIS

-Existen regiones dentro de las CC conservadas *in situ*, que presentan aumentos en la  $[Ca^{2+}]_i$  con diferencia en tiempo: regiones cercanas a la membrana orientadas hacia el exterior de los módulos de células, y en regiones más internas de las células. Lo que refleja la generación de microdominios de  $Ca^{2+}$ , con repercusiones fisiológicas.

-Existen diferentes patrones de activación secuencial en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , en células de un mismo módulo, en el tejido intacto, que obedecen a la demanda del organismo en situaciones específicas.

-Existe una inducción al menos parcial, por la despolarización de la membrana por el aumento de  $K^+$  extracelular, por lo que esto se ve reflejado en el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  bajo este estímulo.

- La actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana es independiente de la activación de canales de  $Na^+$  por lo que no existe una diferencia en la señal de  $Ca^{2+}$  al aplicar el bloqueador de estos canales TTX.

-Los requerimientos de  $Ca^{2+}$  por la célula, son satisfechos por mecanismos independientes, reflejando un alto nivel de regulación. Por lo que la eliminación de  $Ca^{2+}$  del medio extracelular puede ser compensado al menos en parte, por las reservas intracelulares de este ión.

## 5. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es mostrar los patrones en las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  y el reconocimiento de eventos transitorios de  $Ca^{2+}$  en CC medulares individuales y en conjunto.

### 5.1 Objetivos particulares

1. Reconocer los tipos de patrones de oscilación la  $[Ca^{2+}]_i$  existentes en células con actividad espontánea.
2. Determinar la diferencia en el incremento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_i$  entre regiones submembranales (exteriores) e intracelulares (contiguas a reservorios intracelulares).
3. Reconocer la relación en el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en células vecinas dentro de un mismo módulo cromafín.
4. Identificar la dependencia e influencia de la  $[K^+]_e$  en el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .
5. Determinar la posible influencia de los canales de  $Na^+$  sobre el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ .
6. Determinar la participación de los canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana celular y de los reservorios en el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , mediante la eliminación del  $Ca^{2+}$  extracelular.

## **6. MATERIALES Y MÉTODO**

En este trabajo se utilizaron ratones de la cepa Balb-C, los cuales fueron obtenidos de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México; donde se siguen los estándares de la Norma Oficial Mexicana (NOM062-ZOO-1999), que establece las técnicas y métodos adecuados para la producción, cuidado y manejo de animales de laboratorio.

### **6.1 preparación de rebanadas de adrenales**

La preparación "*in situ*" o de tejido intacto de la médula adrenal en cortes de la glándula suprarrenal, se realizó a partir de la disección de ambas glándulas en ratones macho de 8 semanas de vida, con la finalidad de obtener rebanadas que preservaran en condiciones óptimas a las células de la médula. Las glándulas disecadas se mantuvieron en un medio KREBS con la siguiente composición en mM: NaCl 125, KCl 2.5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 26, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, glucosa 10; dicha solución fue mantenida en un sistema que incorpora una mezcla de aire 95 % y 5 % de CO<sub>2</sub>. Este medio es el utilizado como solución estándar en todos los experimentos.

Posterior a la disección, parte del tejido graso que recubre las cápsulas adrenales fue removido conservando sólo estas sobre la corteza de la glándula lo que proporciona soporte en el momento de los cortes; luego, las glándulas fueron colocadas en pozos de aproximadamente 1 ml de volumen con solución estándar adicionado de agar de alto punto de fusión (Invitrogen Corp, Nueva Cork EUA) en una concentración de 3%. Una vez solidificada la solución (~1 min) con las suprarrenales embebidas, se recortaron cubos de aproximadamente 2 mm por lado y se montaron la base de la cámara de corte en un microtomo de navaja vibrante (figura 6.1, VT 1000 S©, Leica Microsystems©, Wetzlar,

Germany) en el cual se mantuvo la solución a una temperatura  $\sim 4^{\circ}\text{C}$  mediante un sistema de enfriamiento diseñado en nuestro laboratorio, esto permitió que el agar permaneciera rígido y se pudieran realizar cortes óptimos. Las glándulas fueron colocadas en la cámara refrigerante del micrótopo, la inclinación de la navaja es ajustable en un cabezal vibratorio de corte, y fue colocada con una inclinación de  $\sim 10^{\circ}$ . Los parámetros de velocidad de avance de la navaja y frecuencia de corte fueron  $0.045\text{ mms}^{-1}$  y  $75\text{ Hz}$  respectivamente, el grosor de la rebanada obtenido fue de  $130\mu\text{m}$ , ya que a este grosor de la rebanada se preservan grupos o módulos intactos de CC, y gracias a la distancia de trabajo del objetivo utilizado en el microscopio ( $0.35\text{ mm}$ ), podemos observar células cargadas y bien preservadas en  $\sim 70\mu\text{m}$  de profundidad. Las rebanadas obtenidas se colocaron en solución estándar descrita anteriormente y fueron mantenidas en este ambiente antes de ser cargadas con el marcador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ .



Fig. 6.1 Microtopo de navaja vibrante (VT 1000 S©, Leica Microsystems©, Wetzlar, Germany, se muestran sus principales componentes)

### 6.1.1 Cargado de las rebanadas con el marcador de $\text{Ca}^{2+}$

Las rebanadas de médula adrenal seleccionadas para registro, fueron montadas sobre cubreobjetos de vidrio previamente tratados con  $0.1\%$  de poli-L-lisina (hidrobromuro de poli-L-lisina; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania),  $50\mu\text{l}$  de esta dilución fueron

colocados en cada vidrio y secados por evaporación al menos 24 hrs antes de colocar las rebanadas sobre ellos. La Poli-L-lisina permite que las rebanadas se mantengan sujetas al vidrio durante los registros. Los cubreobjetos con las rebanadas, se colocaron dentro de pequeños pozos de plástico llenos con 0.5mL de solución estándar.

Para reconocer las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  se utilizó Fluo-4 AM (Fluo-4 Acetoxymethyl, Invitrogen Corp. Nueva York EUA), fluoróforo de alta afinidad por el  $Ca^{2+}_i$  el cual se activa después de permear la membrana celular gracias a su propiedad AM (acetatos ésteres) que modifica por ácidos carboxílicos, activándolo en el interior celular. El Fluo-4 AM fue previamente diluido con DMSO al 20% (dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Steinhem, Alemania) y adicionado con 10  $\mu$ l de Ácido plurónico (de baja absorbancia para UV. Poloxamer 407 -genérico-, Invitrogen Corp, Nueva York EUA) 0.2% como agente surfactante. Facilitando la permeabilidad aplicando calor al ser colocadas en incubadora a una temperatura de 36.5°C por 30 min con atmósfera similar en composición de aire y CO<sub>2</sub>. Las rebanadas fueron lavadas con solución estándar y mantenidas a temperatura ambiente por lo menos 30 min antes de su registro en el microscopio.

## **6.2 Registro de la actividad de $Ca^{2+}_i$**

### **6.2.1 Adquisición de imágenes**

Las rebanadas a registrarse, se colocaron en forma invertida sobre una canaleta de cristal en el fondo de una cámara Plexiglas que permite el flujo constante de solución fisiológica (2ml/min) por medio de un sistema de perfusión por gravedad, dicha canaleta estuvo montada sobre un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 200 Melville, NY) en el cual se utilizó un objetivo de inmersión en aceite Plan Fluo Nikon, con las siguientes características: magnificación 20X, apertura numérica (AN) de 0.75, corrección  $\infty/-$  y

distancia de trabajo de 0.35 mm. El fluo-4 AM fue excitado a una longitud de onda de 488 nm con una luz monocromática de láser de argón (Laser Physics Reliant 100s-400 West Jordan, UT) acoplado a un cabezal de escaneo confocal por disco giratorio (Yokogawa Electric Corp. Tokyo, JAP). La luz de excitación fue filtrada a 488 nm a través de un espejo dichroico y la fluorescencia de emisión también se filtró antes de su incidencia sobre el lente de una cámara digital (PixelFly QE cookecorp.com 270 XS 6848), la cual está sincronizada y controlada con la fuente de iluminación por medio del paquete computacional de adquisición de imágenes Imaging Workbench (versión 6.0.19 Copyright © 2002 – 2006 INDEC BioSystems, Inc. Santa Clara CA, USA) (figura 6.2).

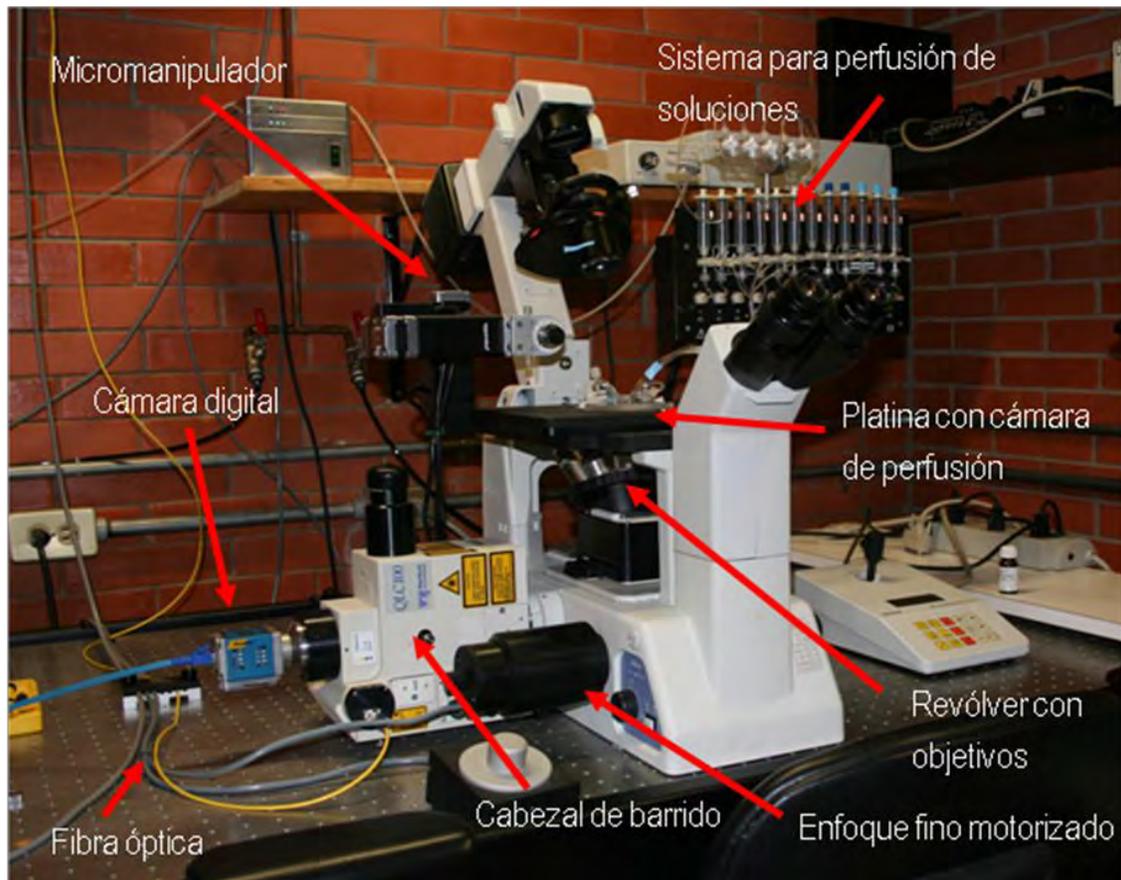


Figura 6.2. Sistema de microscopía confocal de disco giratorio (modificado de imagen realizada por Hernández-Cruz A 2007. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.)

El protocolo para la adquisición de imágenes por este sistema, consistió en la toma de microfotografías del plano central de la rebanada con un tiempo de excitación/adquisición de 30 ms a una frecuencia de 5 Hz durante 90s, con la intención de crear películas (secuencia de imágenes) sobre la actividad de diferentes células en el mismo plano. A la profundidad de visualización permitida por la distancia de trabajo del objetivo ( $\sim 70 \mu\text{m}$ ), encontramos una capa de células sanas, donde la eliminación de fluorescencia fuera de foco por el sistema de microscopía/iluminación confocal, nos permitió reconocer la actividad de una sola capa de células.

### **6.2.2 Microscopía confocal**

Los estudios mediante microscopía confocal se desarrollaron desde los años cincuenta por Marvin Minski. Esta técnica fue reconocida en un principio como microscopio de barrido por etapas de doble enfoque. Esta técnica permite observar capas sucesivas de una muestra sin tener que rebanar el espécimen en finos cortes. La diferencia entre el microscopio óptico común y un sistema confocal, es que cuando en el microscopio óptico el objetivo enfoca luz tomada de planos situados por debajo de un tejido, la imagen se torna incomprensible. En el microscopio confocal se puede recoger luz reflejada del plano de interés y sólo desde él, ya que evita la dispersión de luz proveniente fuera del plano enfocado; esto se logra al pasar la iluminación a través de un objetivo que enfoca los rayos en un haz biconico que puede incidir un punto de luz nítido e intenso sobre una porción mínima de la muestra a la profundidad deseada (Lichtman 1994; White et al. 1987). El sistema confocal reduce la interferencia de estructuras fuera de foco y pueden realizarse entonces, excelentes imágenes de epifluorescencia. El punto de iluminación es obtenido a partir de un rayo laser enfocado y observado con un sistema óptico restringido donde sólo las señales de este punto son detectadas. Una imagen del espécimen completo es construida

a partir de un barrido. Esto difiere del microscopio convencional donde el flujo de luz excitatoria es uniforme sobre el espécimen (White et al. 1987).

La cantidad de fluorescencia emitida depende de distintos factores: la concentración del colorante, la fuente de iluminación, el aumento y la apertura numérica del objetivo, la sensibilidad de la cámara; y obviamente, la  $[Ca^{2+}]_i$ . Por lo anterior, dichas variables fueron controladas y estandarizadas en cada experimento a fin de reconocer únicamente los cambios en la fluorescencia ( $\Delta F$ ) como una medida indirecta de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Las películas en bruto, fueron transformadas a “películas  $\Delta F$ ”:  $\Delta F = F(i) - F_0$ , donde  $F_0$  es una imagen de fluorescencia obtenida a partir del promedio de las primeras 5 imágenes del registro y  $F(i)$  representa cada una de las imágenes obtenidas. En este estudio no se realizaron cálculos para conocer con precisión la  $[Ca^{2+}]_i$  por lo que se manejan unidades arbitrarias (u.a.) para identificar las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ .

### **6.3 Análisis de la actividad de $Ca^{2+}_i$**

Las secuencias de imágenes obtenidas fueron manipuladas mediante el programa de cómputo libre ImageJ (versión 1.41, National Institutes of Health, EUA). Donde para poder identificar a las células con variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  espontáneas o inducidas (células con actividad), se obtuvo el negativo de una imagen en escala de grises, generada por el cálculo de la desviación estándar de la secuencia de imágenes. Este algoritmo está contenido dentro de las herramientas de dicho programa, y permite calcular la desviación estándar en base a las variaciones en la intensidad de fluorescencia en un área determinada o región de interés (ROI -región of interest-). La imagen generada muestra puntos oscuros que corresponden a regiones con mayor diferencia en la variación de su fluorescencia. Los puntos con mayor variación pueden hacer evidentes a las células con mayor actividad. Posteriormente, las

células identificadas fueron marcadas por la herramienta de selección ‚Elliptical‘ de los macros de ImageJ, que reconoce y almacena las coordenadas de las áreas marcadas.

Estas ROI pueden leerse en la secuencia de imagen y reconocer el valor de intensidad de fluorescencia reconocida como el valor dentro de una escala de grises en la secuencia de imágenes y así como poder registrar dichos valores para cada ROI en cada imagen adquirida. Las ROI fueron numeradas correspondiendo a una célula o un área dentro de la célula (Fig. 6.3).

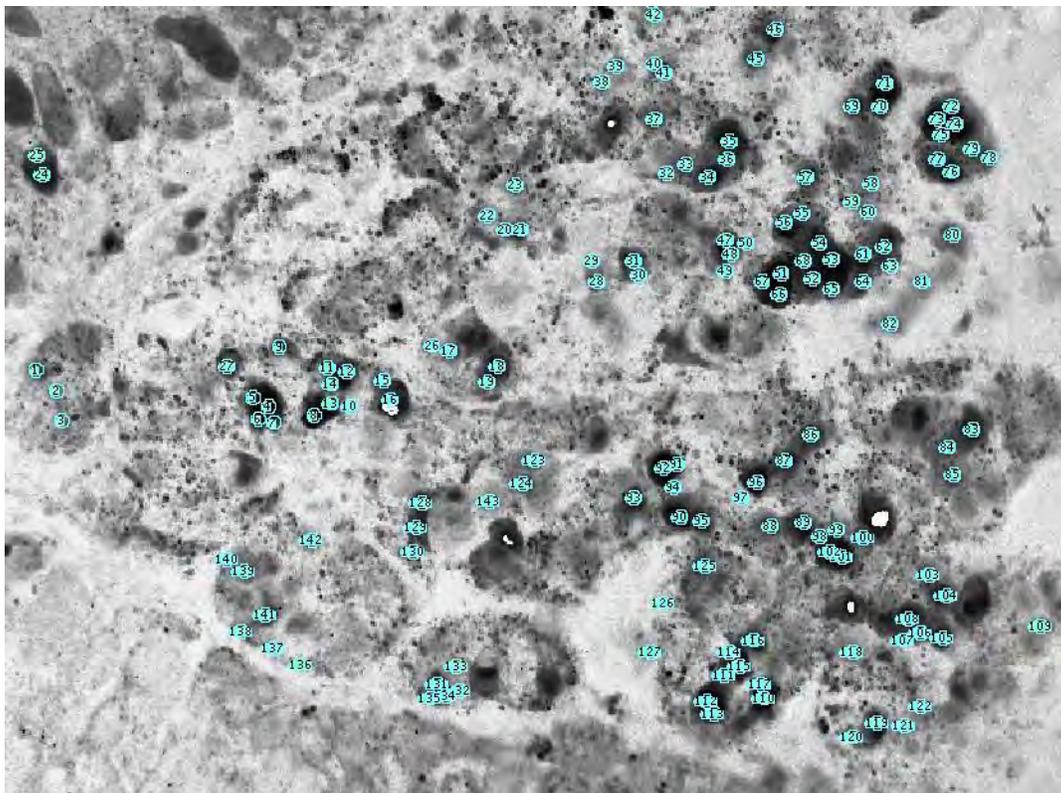


Figura 6.3) Identificación de las células con altas variaciones en la fluorescencia emitida, obtenidas en base a la desviación estándar de la secuencia de imágenes. Se muestra la numeración de las células en un registro control.

Para ilustrar la actividad de todas las áreas de interés o células por registro, se realizaron mapas de la actividad general en el campo registrado mediante el uso de las macros contenidas en el programa Igor Pro 5.0.1 (Wavemetrics Inc, Oregon EUA).

Dichas macros fueron escritas por el Dr. León Islas del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las ordenadas representan el número total de células o áreas, las abscisas representan el tiempo y el valor de  $\Delta F$  es representado por un código de color (u. a.) (figura 6.4).

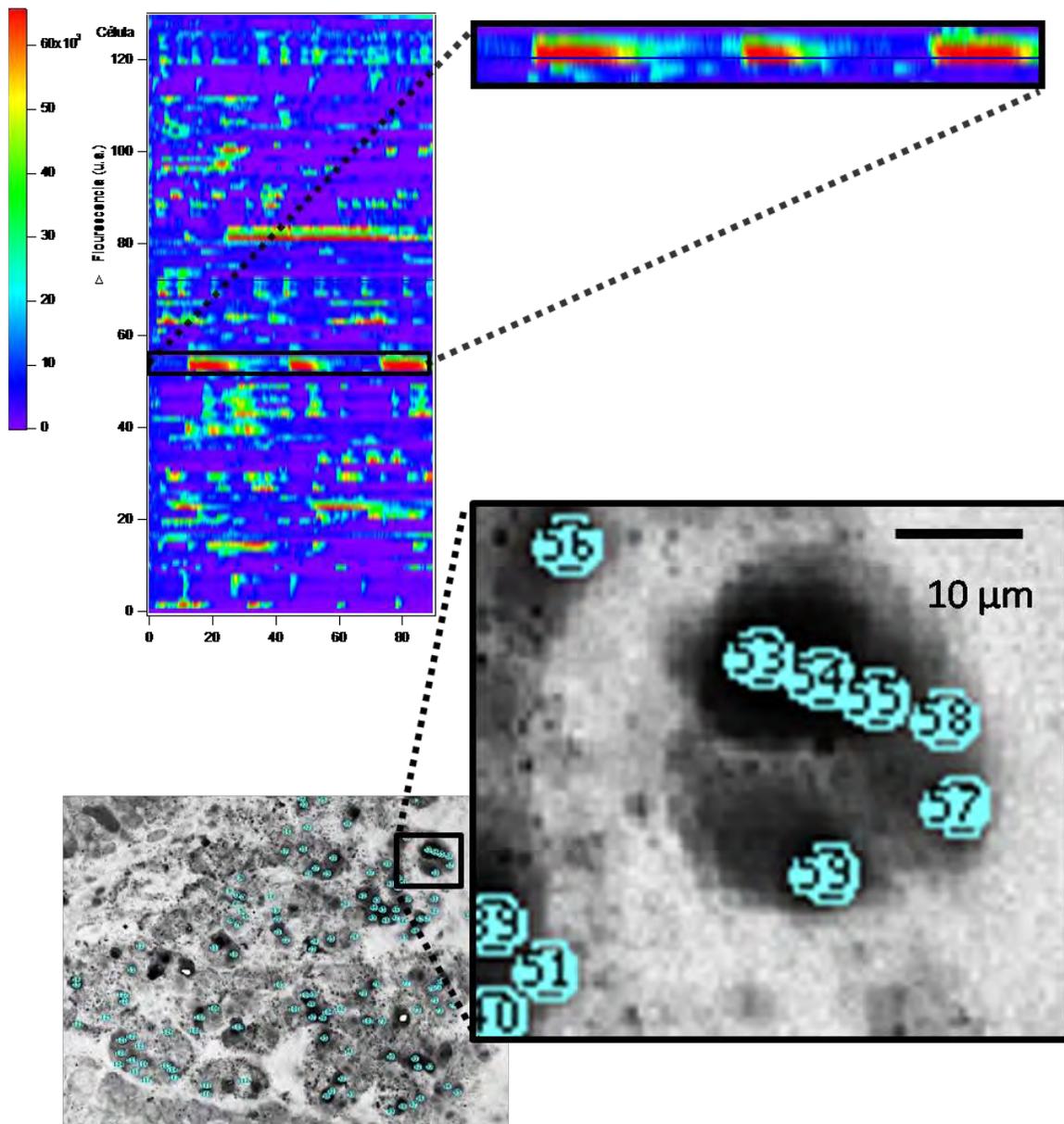


Figura 6.4 Mapa general de la actividad celular en todos los elementos de un registro control. La escala de color representa el aumento de la fluorescencia (u.a. unidades arbitrarias), en el eje X se muestra el tiempo en segundos y en el eje Y se representa cada célula. La microfotografía muestra a las células que corresponden al recuadro en el mapa de la actividad celular.

Los trazos individuales, de células responsivas, fueron las que su señal de fluorescencia se incrementó por más de dos veces la desviación estándar del ruido en reposo. Los datos se graficaron con Origin 6.0 (Microcal Northampton MA, EUA), la composición final de imágenes y su representación fue hecha en Microsoft® PowerPoint 2007 EUA.

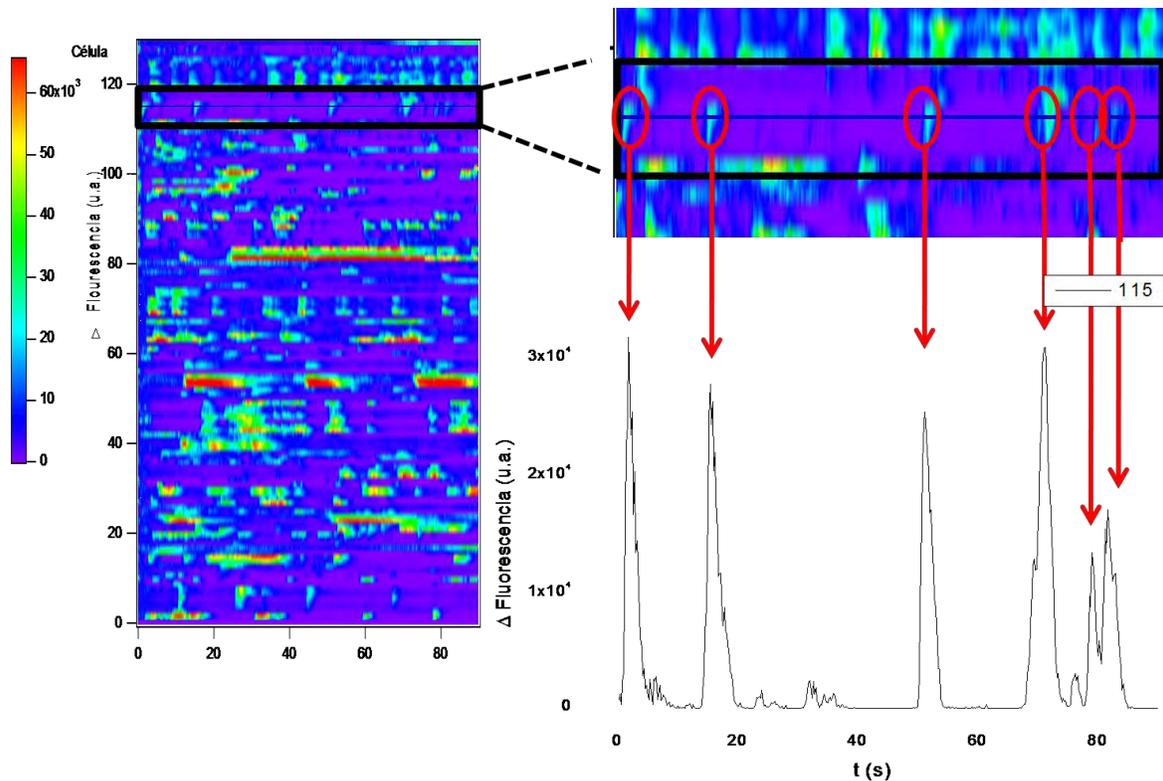


Figura 6.5 Mapa de la actividad celular. Se muestra en detalle la gráfica de una célula con actividad espontánea y la correspondencia de cada señal de Ca<sup>2+</sup> en el mapa general.

#### 6.4 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar. Por lo que se calculó el promedio tanto del número de eventos de cada registro.

Las diferencias estadísticas entre los promedios de dos grupos de experimentos fueron evaluadas por la prueba Wilcoxon y análisis de varianza (ANOVA). Un valor de  $p$  igual o menor a 0.05 fue tomado como el límite de significancia.

## 7. RESULTADOS

Observamos que en el plano de corte, las CC de ratón de la médula adrenal se localizan en cúmulos o complejos (módulos) de entre 7 y 12 células, y que corresponde a lo descrito en trabajos previos sobre el arreglo grupal de las CC en el tejido *in situ* (Kajiwara et al. 1997). Se ha descrito que las CC de la médula adrenal se localizan en complejos denominados por varios autores (Barbara et al. 1998; García et al. 2006; Kajiwara et al. 1997; Moro et al. 1991; Murakami et al. 1989; Parker et al. 1993) como ‘módulos’, los cuales contienen alrededor de 100 células.. El tamaño de las CC medulares es de entre 10 y 15  $\mu\text{m}$ , y el diámetro de los módulos de  $\sim 70 \mu\text{m}$  (Figura 7.1).

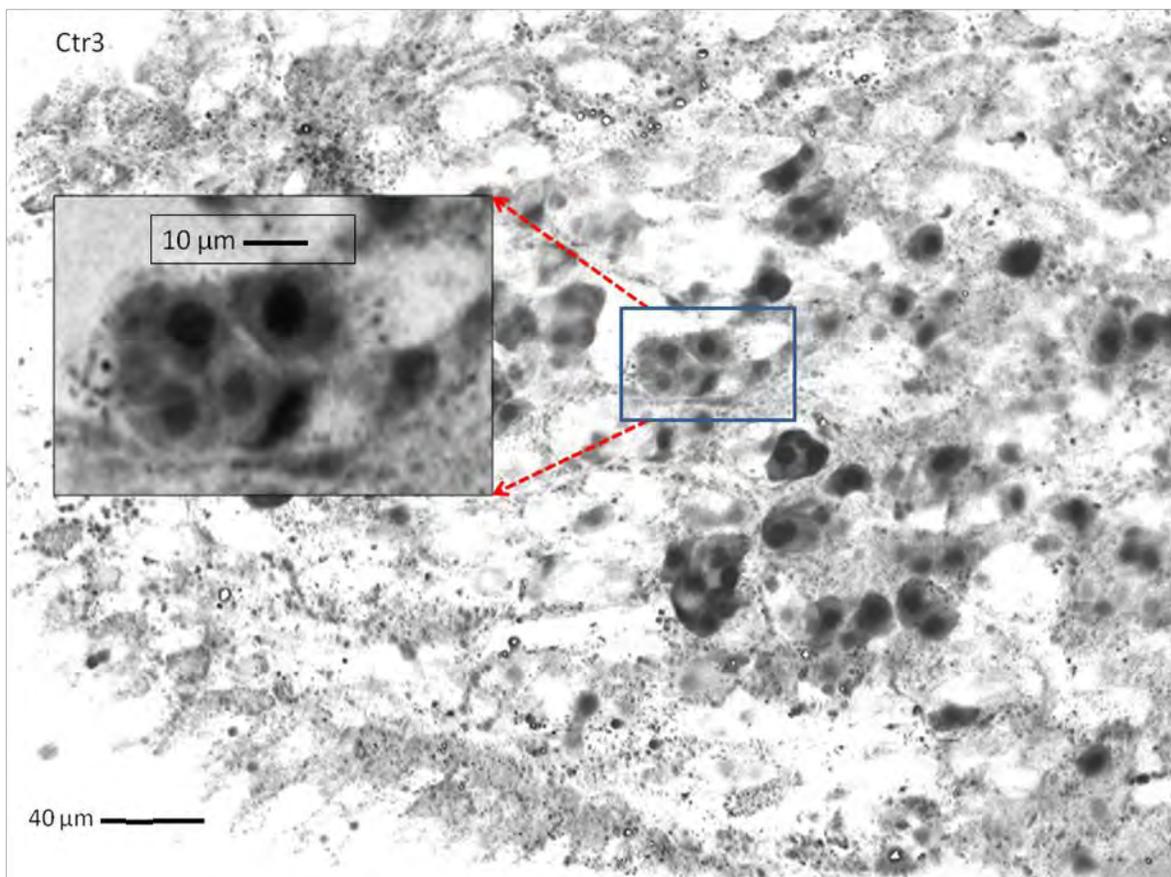


Figura 7.1. Imagen que muestra el tamaño de las células y la proporción de estas en los módulos conservados en el tejido *in situ* así como su distribución en la médula adrenal.

La actividad de las CC en cada registro se resume en mapas de la actividad celular en todo un plano, lo cual fue realizado con el programa Igor Pro 5.0.1 (Wavemetrics Inc, Oregon EUA); tal y como se describió en la sección de metodología (figuras 6.4 y 6.5). Estos mapas, nos permitieron observar a groso modo la relación temporal entre células contiguas pertenecientes a un mismo módulo, por ejemplo, y evaluar su actividad en forma colectiva.

En los diferentes registros, observamos cantidades distintas de células (N) esto radica en la forma “piramidal” de la glándula y la porción medular sobre la que se realizó el corte (figura.1.1), así como el número de células con actividad espontánea. El número de células registradas en cada experimento varía y los totales fueron normalizados equiparando el total de células en cada registro a un 100%.

Encontramos diferentes tipos de señales en las células con actividad espontánea. La frecuencia y velocidad del incremento en la  $\Delta F_i$  es diferente para cada célula, estos parámetros fueron considerados para el reconocimiento de patrones en la actividad de las CC. Pudimos reconocer 6 principales patrones: (1)  $\Delta$  lento de baja frecuencia ( $\geq 1$  s en el  $\Delta$  de la señal,  $\leq 3$  eventos/min), (2)  $\Delta$  lento de alta frecuencia ( $< 1$  s en el  $\Delta$  de la señal,  $> 3$  eventos/min), (3) eventos múltiples (traslapados), (4)  $\Delta$  rápido de baja frecuencia ( $< 1$  s en el  $\Delta$  de la señal,  $\leq 3$  eventos/min), (5)  $\Delta$  rápido de alta frecuencia ( $< 1$  s en el  $\Delta$  de la señal,  $> 3$  eventos/min) y (6)  $\Delta$  rápido ( $< 1$  s) sostenido ( $\Delta$  máximo por más de 5s). De estos tipos de señal, dos son descartados ya que en el primero, la señal es demasiado confusa y puede interpretarse como ruido basal (tipo 3) y el otro, el incremento en la  $\Delta F$  es sostenido por varios segundos (tipo 6) lo que puede sugerir que la célula incrementó el  $Ca^{2+}$  como resultado de una deficiente condición o incluso en proceso de apoptosis (figuras 7.2 y 7.3).

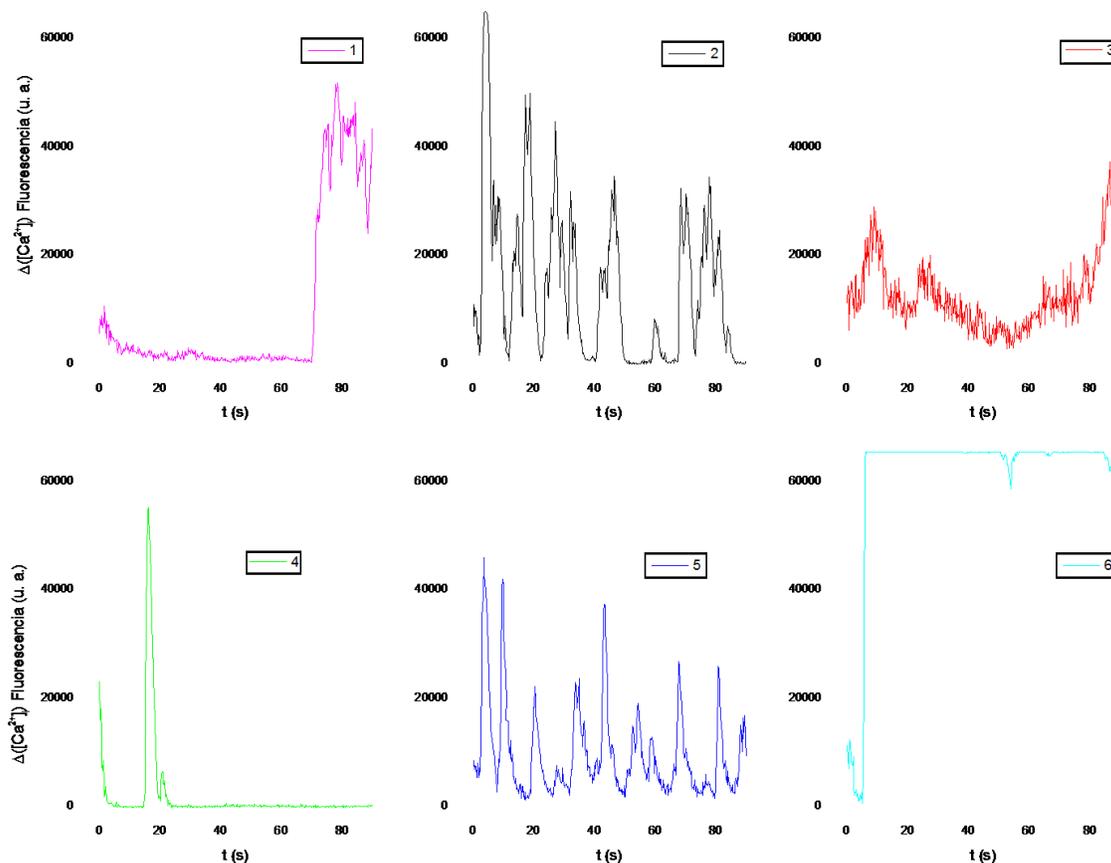


Figura 7.2. Ejemplos de los principales patrones en el  $\Delta$  de la  $[Ca^{2+}]_i$  en CC. 1)  $\Delta$  lento poco frecuente, 2)  $\Delta$  lento de mayor frecuencia, 3) eventos múltiples, 4)  $\Delta$  rápido poco frecuente, 5)  $\Delta$  rápido de mayor frecuencia y 6)  $\Delta$  rápido y sostenido (ver detalles de cada patrón) \* Las señales reconocidas como 3 y 6 fueron descartadas ya que la actividad de estas células refleja un estado comprometido de la célula.

Los porcentajes de estas señales en cada célula se muestran en la figura 7.3. Las células con incremento lento fueron también descartadas para reconocer los posibles transitorios de  $Ca^{2+}$ . Las señales aisladas y con incremento rápido, permiten reconocer eventos individuales y la evaluación de los eventos transitorios entre las regiones de las células. Por lo que para evaluar los posibles transitorios de  $Ca^{2+}$  en las regiones externa e interna de la célula, únicamente fueron consideradas las señales aisladas con incremento rápido (tipo 4 y tipo 5).

Estas proporciones se presentan como promedio de los registros control  $\pm$  error estándar. Las células presentan generalmente más de un tipo de señal, reflejando los patrones complejos involucrados en su actividad.

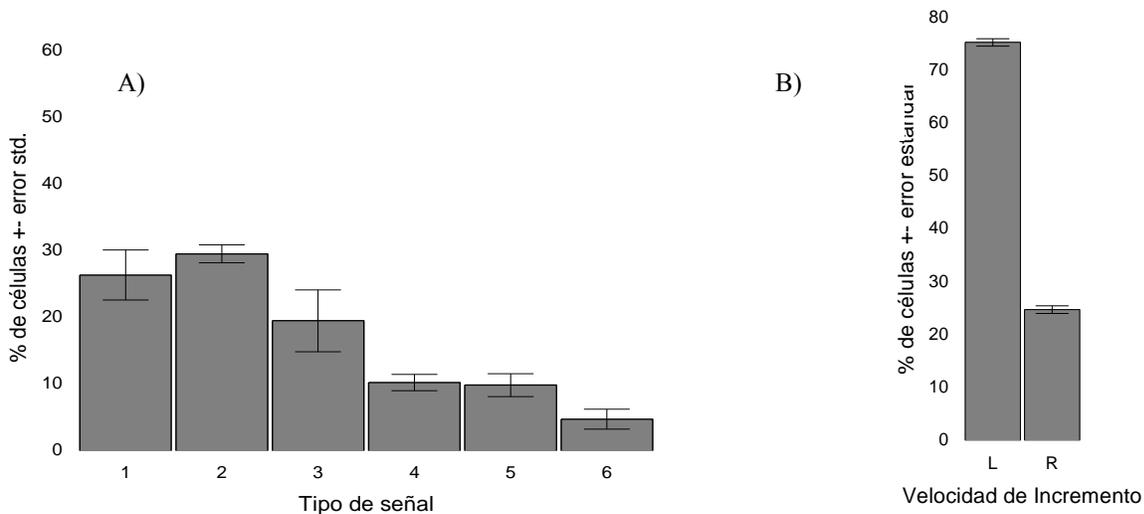
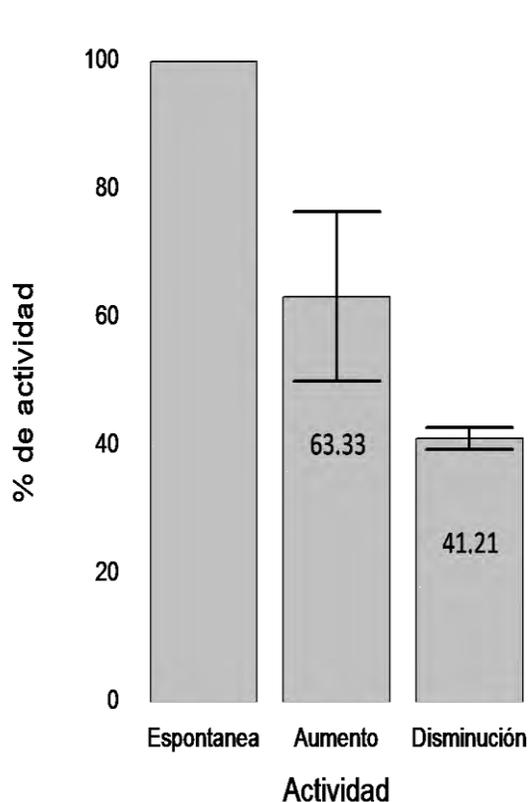


Figura 7.3. Porcentaje de los distintos tipos de señal de  $\text{Ca}^{2+}$  reconocidas en los registros control. A) Porcentaje de los 6 tipos principales de señal, B) porcentaje de células con incremento rápido y aislado vs incrementos lentos en la  $\Delta F$  (L=señal lenta, R=señal rápida)

Las diferentes señales reconocidas bajo estos criterios se presentaron en proporciones distintas en cada registro e incluso una misma célula puede presentar más de un patrón. Por lo anterior, los porcentajes mostrados representan sólo el tipo de actividad predominante en cada célula. Los porcentajes de células en registro control con incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  lento, fue de 75.28%; mientras el porcentaje de señales rápidas y aisladas fue de 24.72%  $\pm$  0.71 (error std.) (figura 7.3).

La relación de células espontáneamente activas respecto a las inactivas, puede verificarse con la aplicación de altas  $[K^+]_e$ , alrededor de 150 mM, lo cual sirve para despolarizar por completo las membranas celulares e inducir el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Sin embargo, se realizaron experimentos donde se incrementó la concentración de  $K^+$  en la solución de perfusión, con el objeto de reclutar células que no presentaron actividad espontánea, o en las cuales esta era despreciable. Se modificó la concentración de  $K^+$  de la solución estándar de 2 mM a 10 mM y se obtuvo la proporción de células reclutadas a esta concentración en relación al total de células con actividad espontánea las cuales corresponden al 100%. Interesantemente observamos que un porcentaje de las células que presentaron actividad espontánea, disminuyeron su actividad después del incremento en la



$[Ca^{2+}]_i$ . El  $63.33 \pm 13.21$  (error estándar) % de las células con actividad espontánea aumentó su actividad, y el  $41.21 \pm 1.67$  % disminuyó su actividad.

Figura 7.4. Células con actividad espontánea y porcentaje de células reclutadas por el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  de 2mM a 10 mM, se muestra el porcentaje de células que presentaron actividad espontánea y que disminuyeron su actividad con el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Porcentajes  $\pm$  error estándar.

La limitante temporal en la adquisición de imágenes nos permite reconocer eventos de duración en el orden de centésimas de segundo por lo que podemos observar señales de

$\text{Ca}^{2+}$ , las cuales se han identificado como cambios relativamente lentos (Fenwick et al. 1982). Estos eventos de  $\Delta$  sostenido o transitorio son posibles de visualizar mediante este sistema, y no así señales más rápidas como los PA, que se encuentran en el rango de unos cuantos milisegundos. La clasificación de estas señales, permitió reconocer señales aisladas (no traslapadas temporalmente), con la finalidad de evaluar uno de los puntos de nuestra hipótesis central, los eventos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en distintas regiones de las células. Por lo anterior, para el análisis de las fluctuaciones transitorias en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fueron consideradas sólo las señales aisladas. Las señales de aumento lento pueden ser cúmulo de varias señales secuenciales o traslapadas, lo cual podría dificultar la evaluación de una sola señal.

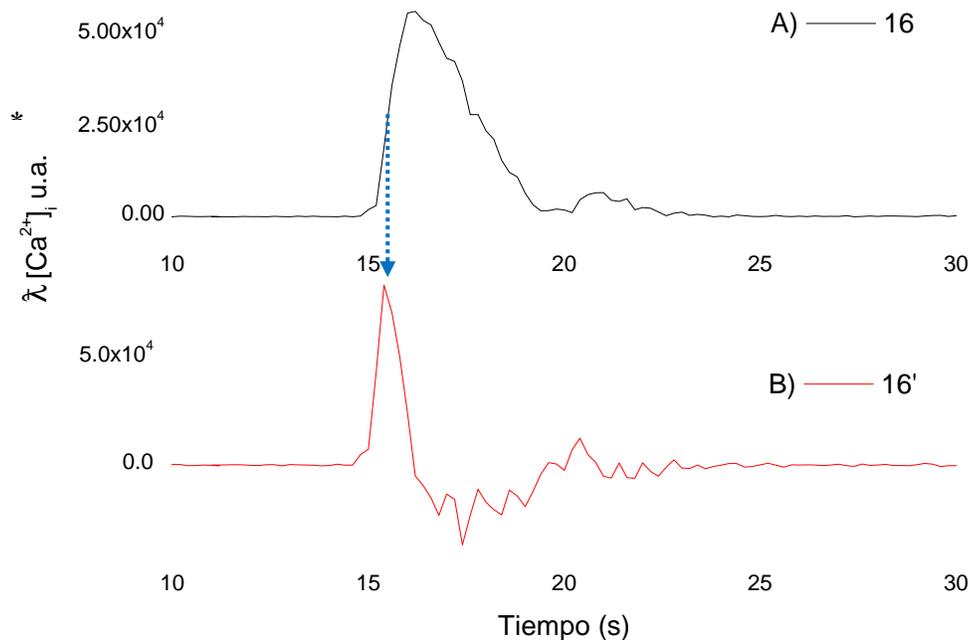


Figura 7.5 A) Ejemplo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}_i$  en bruto, y B) derivada ( $\Delta F/\Delta T$ ) de dicha señal de  $\text{Ca}^{2+}_i$  en un registro control. La flecha indica el momento en que se alcanza el punto medio del  $\Delta$  máximo, el cual corresponde con el punto máximo en la derivada de dicha señal sobre el tiempo (velocidad máxima en el  $\Delta$ ).

\* Los valores del  $\Delta$  de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mostrados solamente reflejan un aumento en la fluorescencia y no la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  real por lo que las unidades se indican como u.a. (unidades arbitrarias).

Para reconocer el momento preciso en que se presentó cada  $\Delta$  en la  $[Ca^{2+}]_i$ , se obtuvo la derivada de las señales a partir de los valores en bruto de los  $\Delta$  en la fluorescencia. Este punto corresponde al de mayor incremento significativo  $\Delta$  en la  $[Ca^{2+}]_i$ , de cada señal en bruto. La derivada representa un momento de mayor velocidad en la  $\Delta F$  (variación de fluorescencia) sobre el momento ( $\Delta t$ ); derivada de la fluorescencia sobre el tiempo ( $\Delta F/\Delta t$ ).

Al analizar regiones externas e internas de CC con actividad espontánea se encontraron eventos de  $Ca^{2+}$  transitorios en células que presentaron señales individuales. El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en las regiones externas puede deberse a la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática, y en las regiones internas posiblemente debido al incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  proveniente de diversos reservorios intracelulares como las mitocondrias, el retículo endoplásmico, o el núcleo

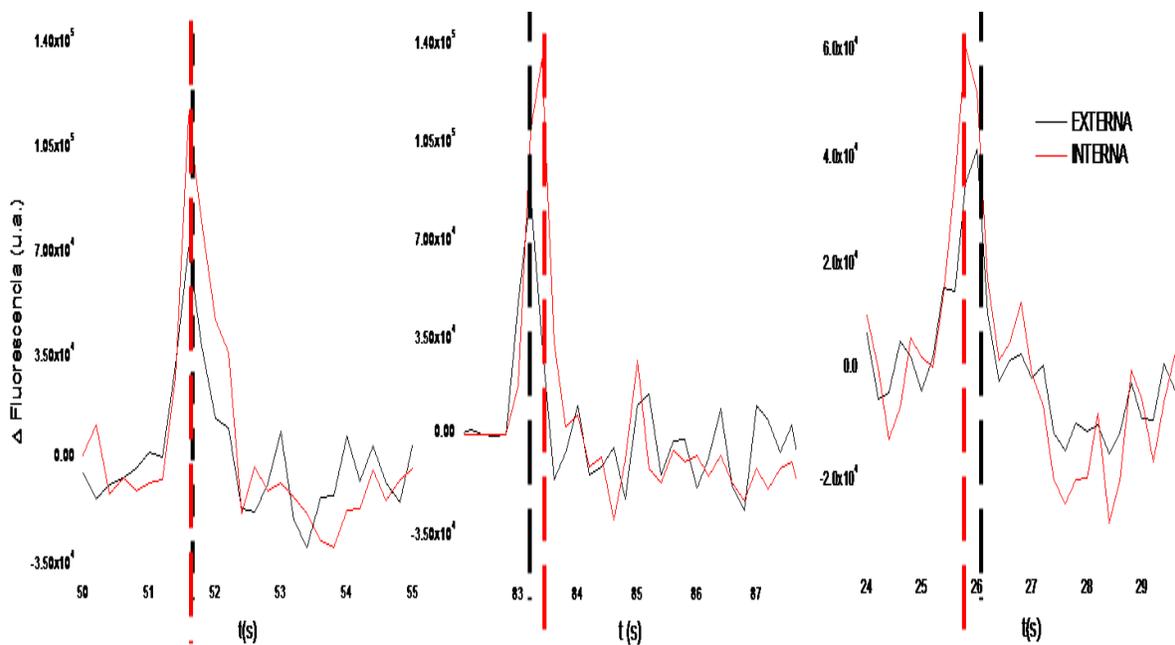


Figura 7.6. Reconocimiento de eventos transitorios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en distintas regiones de la célula.

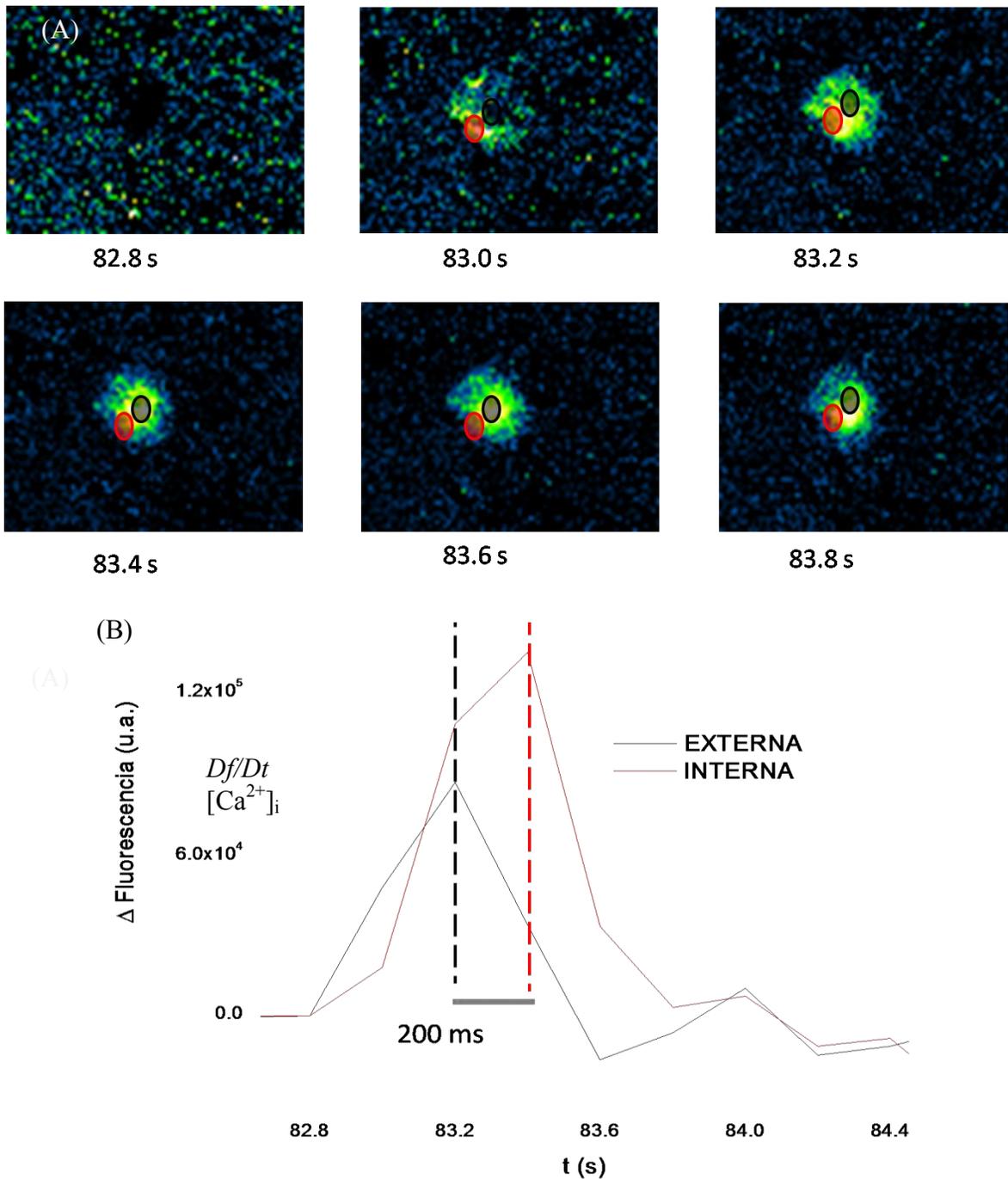


Figura 7.7. (A) Imágenes secuenciales que muestra el desfase en el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el cual se inicia en el exterior de la célula y posteriormente el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  se presenta en el centro de la célula., (B) gráfica que ilustra la diferencia temporal de las dos señales de  $\text{Ca}^{2+}$ . \*Los colores de la imagen son irreales y representan una escala en el aumento de la intensidad de la fluorescencia. \*\*Las señales fueron reconocidas al evaluar la derivada de la señal en bruto, la derivada indica el momento de máxima velocidad en el incremento de la señal por lo que el valor de „x’ es irrelevante.

Una de las hipótesis de este trabajo es el reconocimiento de oscilaciones transitorias en regiones distintas de la célula y de las diferencias temporales en el inicio de la actividad en dichas regiones. Las señales transitorias que se observaron evidencian el inicio desfasado en la región externa de la célula respecto a la región más interna. Identificamos señales desfasadas en 200, 400 y 600 ms entre una región y otra. Encontramos señales sincrónicas además dentro del registro de una misma célula. La activación desfasada se presentó en menores ocasiones, siendo más propenso el inicio en el exterior de la célula y hacia el interior.

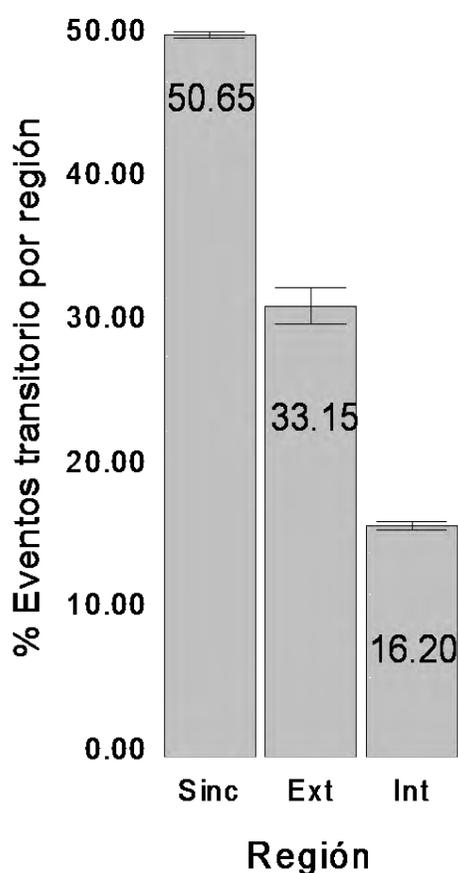


Figura 7.6. Porcentajes del inicio de las señales por región donde se presenta el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inicial. (S) señales sincronizadas, (E) de inicio en la región externa, (I) de inicio en la región interna. Los valores representan promedios  $\pm$  error estándar.

Mostramos los porcentajes de los eventos transitorios y los porcentajes de la región donde se inicia el evento transitorio de cada señal, estos porcentajes, fueron obtenidos a partir de 95 células en tres distintos experimentos. Se muestran los porcentajes de dichos experimentos los cuales fueron  $50.65 \pm 0.26$  (error estándar) con inicio sincrónico,  $33.15 \pm 1.26$  con inicio en la región externa y  $16.20 \pm 0.30$  con inicio en la región interna. Estos porcentajes se muestran en la figura 7.6.

El aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  de las células en módulos no siempre es sincrónico y la respuesta colectiva o modular de las células cromafines parece responder al tipo de estímulo a que están sometidas, la inervación de fibras posganglionares a una o varias células iniciadoras o líderes dentro de un módulo puede ser determinante, así como la comunicación parácrina entre las células de un mismo módulo y la difusión de calcio como parte de la respuesta celular colectiva de las CC.

Observamos células que se activan casi simultáneamente o con un retardo de tiempo menor al tiempo de adquisición de la imagen o dentro del intervalo entre una imagen y otra y células que se activan con un retardo mayor, sincrónico pero con un retardo de magnitud del orden de segundos.

La actividad eléctrica espontánea fue frecuentemente observada en presencia de tetrodotoxina (TTX). Se ha observado que la aplicación de bloqueadores de los canales de  $K^+$  como el tetraetilamonio (TEA) y Bario ( $Ba^{2+}$ ) en gran medida incrementan la amplitud de los potenciales de acción. El simple aumento en la concentración de  $K^+$  aumenta la actividad de las CC, como observamos en este estudio.

Las células siguen teniendo actividad en el incremento del  $Ca^{2+}$  citosólico al eliminar el  $Ca^{2+}$  extracelular, aunque se nota una disminución en la actividad general de las células.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Las células cromafines de la médula adrenal *in situ* presentan aumentos transitorios de $\text{Ca}^{2+}$ localizados.

El registro de la actividad de  $\text{Ca}^{2+}_i$  por medio de esta técnica permite inferir varios de los mecanismos implicados en la respuesta grupal o colectiva de las CC; así como las variaciones en diversas regiones intracelulares individuales. Es evidente que el papel de los canales en la membrana comprende tanto mecanismos independiente como conjugados con la actividad de los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  quienes también controlan el incremento de este ión. Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  en las CC son espontáneos e inducidos (Nassar-Gentina et al. 1988), lo cual concuerda con lo observado en el presente estudio.

Ha estado en discusión la posible distribución de los diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la superficie de la membrana (García et al. 2006). En este trabajo encontramos que existen diferencias temporales en el inicio del incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , esta variación significativa no es visible sin embargo, en el total de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  tanto en regiones submembranales hacia el exterior de los módulos de CC medulares, en comparación con la región central o más interna de la misma célula.

En este trabajo observamos que el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se presenta transitoriamente en las regiones cercanas a la membrana plasmática y en las regiones intracelulares, en distintas proporciones, además de una activación sincrónica en estas regiones, esto puede deberse a la activación de mAChr. Se ha mostrado que los agonistas muscarínicos estimulan la formación de DAG e  $\text{IP}_3$  de los fosfoinosítidos a través de la activación de la PLC. La cual ocurre independientemente del  $\text{Ca}^{2+}$  externo contrario a lo que sucede con la estimulación nicotínica o por  $\text{K}^+$  extracelular elevado, el cual parece que requiere del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y de un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Olivos y Artalejo, 2008). Esto se ve

reflejado en gran medida mediante la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, donde observamos que la activación se limita en gran parte a la acción sólo de los reservorios intracelulares.

## **8.2 Participación de los canales de $\text{Na}^+$ en las oscilaciones de $\text{Ca}^{2+}$**

Las sinapsis nicotínicas han sido observadas en rebanadas de la médula adrenal, por técnicas con alta resolución temporal, como lo puede ser la modalidad de célula completa por medio del pinzamiento de membrana. Pueden detectarse corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC), por ejemplo, Barbara y Takeda (1996) mostraron que estas se presentan en el orden de unos cuantos milisegundos, lo cual es demasiado rápido para poder observarlas mediante la técnica que hemos utilizado, la cual nos permite observar fenómenos sólo en el orden de unas cuantas decenas de milisegundos.

Se ha observado que existe una inhibición parcial en la liberación de catecolaminas al aplicar el bloqueador de los canales de  $\text{Na}^+$  TTX (Biales et al. 1976; Fenwick et al. 1982<sup>a</sup>; Nassar-Gentina et al. 1988), esto es debido a que existe la participación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, los cuales se activan sólo después de despolarizaciones, los cuales contribuyen en medida al incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Sin embargo el cambio imperceptible en este tipo de actividad, mediante la técnica utilizada en este estudio puede omitir este tipo de señales que son mucho más rápidas y superan la resolución temporal de nuestro sistema. Se ha visto que los EPSC pueden ser insensibles a TTX y dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurriendo en cúmulos tipo disparo (Barbara y Takeda, 1996). Estos disparos son evidentes en el presente estudio y se mostró que son independientes del  $\text{Na}^+$ . Lo que puede obedecer a la expresión de canales de bajo umbral que pueden activarse casi „espontáneamente” bajo discretas variaciones en el potencial de membrana.

### **8.3 Activación secuencial y conjunta en módulos cromafines**

Las CC cuentan con diversos mecanismos para distintas respuestas bajo estímulos específicos diferentes, las cuales pueden ser colectivas o individuales. Ya que la respuesta adrenérgica debe ser eficiente, suficiente y precisa. Martin et al. (2003), sugieren que existen interacciones de larga duración las cuales pueden ocurrir por medio de dos formas de señalización intercelular, la transmisión sináptica colinérgica y el acople mediado por uniones comunicantes en la médula adrenal.

Observamos una activación diferencial en las células pertenecientes a un mismo módulo o cúmulo de células cromafines. Estos módulos han sido descritos en numerosos trabajos ya que se cree que la activación colectiva de las CC medulares ocurre bajo determinados estímulos y en consecuencia se genera una respuesta sumable. La participación diferencial de las CC en el mismo módulo puede estar reflejando su organización estructural y funcional dentro de la médula donde actúan de forma conjunta bajo diferentes demandas homeostáticas. Kajiwara et al. (1997) mostraron que en CC medulares de rata *in situ* existen cúmulos o complejos rodeados por tejido conectivo difuso de un diámetro aproximado de 80  $\mu\text{m}$ , En nuestro estudio en CC de ratón observamos complejos de 7 a 12 células de aproximadamente 70  $\mu\text{m}$ .

Existen diversos procesos que modulan la respuesta en las CC, por ejemplo, la exposición aguda, crónica o repetida en los organismos al estrés incrementa la síntesis de catecolaminas en el sistema simpatoadrenal. Este incremento es debido principalmente a una regulación a la alta de las actividades de enzimas biosintéticas (Nankova y Sabban 1999). Las repuestas a estrés se modulan por la invasión de las CC medulares, pero también por la presencia de distintos elementos como la variedad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  que se conoce en la actualidad. Una variedad de factores estresantes incrementan la abundancia

relativa de la mRNA de TH, DBH y PNMT; adrenomedulares. También se incrementan los niveles de mRNA de proencefalina (PENK) y NPY (Nankova y Sabban 1999).

Los patrones son muy irregulares, lo que se observó en los presentes registros, lo que puede reflejar el nivel de estrés a que las células están sometidas, distinto en gran medida a las CC que han sido estudiadas en cultivo y en las cuales es evidente la expresión de características disímiles en su contraparte con las CC en el tejido *in situ*.

Al requerirse una respuesta masiva de las cromafines estas pueden presentar una actividad colectiva y sincrónica mediante grupos de células o módulos, este mecanismo podría estar activado por la innervación de fibras posganglionares a una o varias células iniciadoras o líderes dentro de un módulo, posteriormente la comunicación parácrina y muy posiblemente mediante uniones comunicantes entre las células de un módulo la señal de  $Ca^{2+}$  podría ser difundida al resto de las células, generando una respuesta celular colectiva. Por otra parte, se observó un tipo de actividad que podría ser similar a la existente en células “marcapaso”. Estas células pudieran activar a otras células dentro del mismo módulo, las células dentro del módulo pueden tener o no una activación sincrónica con otras células, aunque generalmente no muestran respuestas colectivas, sino frecuentes y constantes. Este tipo de actividad pudiera ser posible por la participación de canales de calcio tipo T, de bajo umbral de activación y que se expresan también en diversas células de diferentes tejidos. Las señales de calcio intracelular se inician tanto en alguna región cercana a la membrana celular como por la salida de iones de los reservorios intracelulares, esta información aporta evidencia de la generación de los llamados microdominios de calcio (MDCa<sup>2+</sup>). Observamos que existe un incremento secuencial en la  $[Ca^{2+}]_i$  en regiones cercanas a las caras externas de la célula con respecto a las demás células del grupo o módulo, y posteriormente a la región opuesta, o viceversa, sugiriendo

implicaciones fisiológicas derivadas del arreglo y disposición espacial. Sin embargo, el arreglo modular de las células no siempre es sincrónico, sugiriendo que la respuesta global, colectiva o modular de las CC es el resultado del tipo de estímulo a que estén sometidas.

Este tipo de actividad persistente podría permitir una eficiente respuesta rápida y colectiva en comparación con la secreción inducida por el acople del agonista a los receptores de la membrana la cual sería, en principio, un poco más lenta. Observamos una estrecha relación entre células de un gran número de módulos permitiendo una eficiente respuesta conjunta, por ejemplo en respuesta a situaciones de estrés agudo.

#### **8.4 Inactivación y mecanismos de retroalimentación**

La médula adrenal contribuye con respuestas neuroendócrinas, a la estimulación eléctrica de la terminal periférica del nervio esplácnico, liberando en mayor medida: encefalinas, modestamente al péptido vaso intestinal (VIP), y en menor proporción al neuropéptido Y (NPY) y al péptido gastro-liberado (GRP). Estas diferencias se deben a un fuerte aumento de la inactivación y la eliminación del NPY adrenal en respuesta a la hipoglicemia (Edwards y Jones 1993). La liberación de este tipo de péptidos y encefalinas co-liberadas con las catecolaminas está relacionada con un sistema de retro-alimentación negativa, por lo que ciertas respuestas a la estimulación de algunas vías nerviosas autónomas están sustancialmente potenciadas por un estímulo de alta frecuencia, mientras otras ni siquiera se ven afectadas (Bloom et al, 1988; Edwards y Jones 1993).

Además del estímulo por el nervio esplácnico, las CC activan diferentes vías de activación que tiene que ser reguladas para evitar un colapso del organismo por la respuesta adrenérgica agresiva, por lo que los mecanismos de „apagado’ de estas señales deben estar finamente regulados. Mediante este tipo de estudios es posible visualizar la relación

intercelular y la participación de mecanismos de modulación parácrina, la cual es eliminada casi por completo en los estudios en CC en cultivo.

Las CC constan de numerosas conexiones nerviosas aferentes y eferentes, dentro de las que se incluyen inervaciones sensoriales simpáticas y parasimpáticas; además de neuronas ganglionares adrenales y sus axones ascendentes (Díaz-Flores et al. 2008). Por lo que el tejido medular está influenciado por distintos partícipes en la activación de las CC como lo puede ser la presencia de botones sinápticos que continúan teniendo una ligera secreción de ACh. Por lo que esto debe ser tomado en consideración.

### **8.5 Registro de la actividad de calcio *in situ* por fluorescencia**

Se han realizado estudios sobre la movilización del  $Ca^{2+}_i$  por fluorescencia, para dilucidar diversos mecanismos, como lo muestran estudios en ratas y ratones (Martin et al. 2001; Yamagami et al. 2002, respectivamente). La resolución temporal de nuestro sistema de adquisición de imágenes es una de las limitantes ya que pueden presentarse señales muy rápidas del aumento de  $Ca^{2+}_i$  que pueden pasarse por alto al no estar dentro de los intervalos de adquisición de la señal. Puede además presentarse un problema en el análisis de las señales, debido a la cinética de las mismas, ya que diferentes patrones en las células pueden presentarse en el momento de la aplicación de los distintos tratamientos. En algunas células se presenta más de un patrón de oscilación lo cual pudo representar un problema de apreciación.

La frecuencia y velocidad de los eventos es muy variable en cada célula, estos parámetros fueron considerados para el reconocimiento de los diferentes patrones de actividad en los registros. Sin embargo mucha de la información puede ser limitada al sólo poder observar a través de pequeñas ventanas temporales. Por lo anterior es necesario

perfeccionar la técnica de adquisición, donde algunos parámetros como la sensibilidad de la cámara utilizada, el paquete computacional para la adquisición de las imágenes, ya que un equipo de adquisición de imágenes más rápido permite percibir breves cambios en la concentración del calcio intracelular que podrían mostrar potenciales de acción breves o algún otro tipo de actividad que no sea captada en el lapso entre la adquisición de una imagen y otra, a pesar de esto, pudimos evaluar algunos aspectos importantes de las CC en el tejido, ya que las señales de calcio son generalmente lentas en el orden de milisegundos e incluso segundos. El escaneo confocal también puede mejorar la resolución temporal, permitiéndonos ver eventos que suceden en escalas temporales más rápidas.

Además de estos factores, no debemos dejar de lado la resolución óptica que permite discernir entre los elementos presentes en el tejido. En referencia a la resolución óptica, la proximidad de las células y los cúmulos de estas, podrían derivar en una errónea apreciación visual, confundiendo regiones de interés de una célula con alguna de su vecindad y obtener registros erróneos de su actividad, al delimitarla de forma equivocada. Sin embargo, esto puede ser resuelto en gran medida con la utilización de un sistema de microscopía confocal, el cual permite observar únicamente el plano focal de interés y disminuir la contaminación visual por imágenes carentes de nitidez fuera de foco, a fin de poder resolver entre células de contacto muy estrecho

## 8. CONCLUSIÓN

Las células cromafines de la médula adrenal presentan actividad espontánea y responden a diversos estímulos, con una respuesta en el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico diferencialmente, promoviendo la activación de distintos procesos intracelulares.

Los patrones en las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico clasificados por la cinética de su señal, reflejan mecanismos de activación diferencial entre canales de la membrana y el aporte de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de reservorios intracelulares.

La estimulación por medio de la elevación de  $\text{K}^+$  extracelular muestra que la activación se genera en canales de la membrana y posteriormente en el interior celular, además la eliminación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular refleja la participación independiente de reservorios intracelulares en la generación de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Distintas células presentan patrones de oscilación diferencial en la  $\text{Ca}^{2+}$  en las regiones expuestas o no a diversos factores de regulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Esta activación diferencial se presenta en elementos dentro de un mismo módulo de células cromafines en la médula adrenal, sugiriendo que algunos de estos factores pueden ser la inervación de algunos elementos, y su cercanía al exterior del módulo donde es evidente una participación regionalizada, muy probablemente debida a canales de la membrana disgregados en estas regiones.

Estas observaciones permiten formular nuevas interrogantes sobre los mecanismos implicados en el control estímulo-control y refuerzan las hipótesis sobre la generación de microdominios, como una posible consecuencia del arreglo en la disgregación y la disposición espacial entre otros; de la organela, vesículas y una amplia variedad de tipos de canales iónicos. Los cuales están presentes en las CC de la médula adrenal en condiciones fisiológicas.

## 8. REFERENCIAS:

### LIBROS

- ◆ Artalejo A. R., 1995. “*Electrical properties of Adrenal Chromaffin Cells*” en *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells*, Scherübl H., Hescheler J. (Eds.). CRC press Inc. USA.
- ◆ Dale P., Augustine G., Fitzpatrick D., Katz L., La Mantia A., McNamara J., 1997. “*Invitación a la Neurociencia*”. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- ◆ Fanjul M.L., Hiriart M., Fernández de Miguel. F.eds., 1998. “*Biología Funcional de los Animales*”, Siglo XXI Editores. México.
- ◆ Genuth S. M., 2004, “*The Adrenal Glands*” Capítulo 45, en Berne R. M., Levy M. N., Stanton B. A., (eds.) *PHYSIOLOGY* 5a ed. Elsevier Science Inc., St. Louis MO, EUA 900-919 pp.
- ◆ Le Dourain N. M., 1995 “*From the APUD to the Neuroendocrine Systems: A developmental perspective*” en *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells*, Scherübl H., Hescheler J. (Eds.). CRC press Inc. USA.
- ◆ Norris David O. 1996, “*Vertebrate Endocrinology*”, 3ra ed. Academic Press Inc.USA.
- ◆ Randall D., Burggren W., Kathleen F., 1997. “Communication along and between neurons” Chapter 6, en Eckert: *Animal Physiology* 4th ed. 163-217 pp.
- ◆ Richerson G. B., 2003, *The Autonomic Nervous System* en Boron W.F., Boulpaep E. L. (eds.) *Medical Physiology*, Saunders Elsevier Science, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 378-398 pp.
- ◆ Verdugo D. L. 2005. “*Médula Suprarrenal*” Capítulo 50, en Drucker C. R., (ed.) *Fisiología Médica. El Manual Moderno*. México. D.F. 559-58 pp.
- ◆ Willis W. D., 2004, “*The Autonomic Nervous System and Its Central Control*” Capítulo 11, en Berne R. M., Levy M. N., Stanton B. A., (eds.) *PHYSIOLOGY* 5a ed. Elsevier Science Inc., St. Louis MO, EUA. 206-220 pp.

## ARTICULOS

- ◆ Akiyama T., Yamazaki T., Mori H., Sunagawa K., 2004, “*Simultaneous monitoring of acetylcholine and catecholamine release in the in vivo rat adrenal medulla*”, *Neurochemistry International*, 44: 497-503 pp.
- ◆ Albillos A., Gandía L., Michelena P., Gilabert J., del Valle M., Carbone E., García A. G., “*The Mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells*”, *Journal of Physiology*, 494.3 687-695 pp.
- ◆ Artalejo C. R., Ariano M. A., Perlman R. L., Fox A. P., 1990, “*Activation of facilitation calcium channels in chromaffin cells by D1 dopamine receptors through a cAMP/protein kinase A-dependent mechanism*”, *Nature* 348:239-242 pp.
- ◆ Artalejo C. R., Dahmer M. K., Perlman R. L., Fox A. P., 1991 “*Two Types of Ca<sup>2+</sup> currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type*”, *Journal of Physiology* 432: 681-707 pp.
- ◆ Axelrod J., 1962, “*Purification and Properties of Phenylethanolamine-N-methyl Transferase*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 5: 1657-1660 pp.
- ◆ Bahena-Trujillo R., Flores G., Arias-Montaña J. A., 2000 “*Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central*”, *Rev Biomed*, 11: 39-60 pp.
- ◆ Barbara J., Poncer J. C., McKinney R. A., Takeda K., 1989, “*An Adrenal Slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervations*”, *Journal of Neuroscience Methods*, 80: 181-189 pp.
- ◆ Barbara J., Takeda K., 1996, “*Quantal release at a neuronal synapse from rat adrenal gland*”, *Neurobiology*, 93: 9905-9909 pp.
- ◆ Bean B. P., 2001 “*Calcium channels*”, *Encyclopedia of Life Science*, 1-7 pp.
- ◆ Benavides A., Calvo S., Tornero D., González-García C., Ceña V., 2004, “*Adrenal Medulla calcium channel population is not conserved in bovine chromaffin cells in culture*”, *Neuroscience*, 128: 99-109 pp.
- ◆ Biales B., Dichter M., Tischler A., “*Electrical excitability of cultured Adrenal Chromaffin Cells*”, *Journal of Physiology* 262: 743-753 pp.

- ◆ Bootman M. D., Collins T. J., Peppiat C. M., Prothero L. S., MacKenzie L., De Smet P., Travers M., Tovey S. C., Seo J. T., Berridge M. J., Ciccolini F., Lipp P., 2001, “*Calcium signaling-an overview*”, *Cell & Developmental Biology*, 12: 3-10 pp.
- ◆ Brandt B. L., Hagiwara S., Kidokoro Y., Miyazaki S., 1976, “*Action Potentials in Rat Chromaffin Cell and Effects of Acetylcholine*” *Journal of Physiology*, 263: 417-439 pp.
- ◆ Cannon W. B., 1929, “*Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rag*” Appleton. New York.
- ◆ Cannon W. B., 1929, “*Organization for Physiological Homeostasis*” *Physiological Reviews*. 9: 399-431 pp.
- ◆ Chan S., Polo-Parada L., Smith C., 2005, “*Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices*”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 435: 65-73 pp.
- ◆ Crivellato E., Nico B., Ribatti D., Nussdorfer G. G., 2006, “*Catecholamine Release by Chromaffin Cells: A lesson from mast cells*”, *General and Comparative Endocrinology* 146: 69-73 pp.
- ◆ Díaz-Flores L., Gutierrez R., Varela H., Valladares F., Alvarez H., Borges R. 2008 “*Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells*”, *Acta Physiologica*. 192: 145-163 pp.
- ◆ Donald A. N., Wallace D. J., McKenzie S., Marley P. D., 2002, “*Phospholipase C-mediated is not required for histamine-induced catecholamine secretion from bovine chromaffin cells*”, *Journal of Neurochemistry*, 81: 1116-1129 pp.
- ◆ Doupe A. J., Landis S. C., Patterson P. H., 1995 “*Environmental influences In the Development of Neural Crest Derivatives: Glucocorticoids, Growth Factors, and Chromaffin Cell Plasticity*” *The Journal of Neuroscience* Vol.5, 8: 2119-2142 pp.
- ◆ Duflo F., Zhang Y., Eisenach J. C., 2004 “*Electric Field Stimulation to Study Inhibitory Mechanisms in Individual Sensory Neurons in Culture*”, *Anesthesiology* 100: 740-743 pp.
- ◆ Dunlap K. J., Luebke J. L., Turner T. J., 2001, “*Exocytotic Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian central neurons*”, *Trends in Neuroscience*, 18: 89-98 pp.
- ◆ Drucker-Colín R., Verdugo-Díaz L., Méndez M., Carrillo-Ruiz J., Morgado-Valle C., Hernández-Cruz A., Corkidi G., 1994, “*Comparison between low frequency field*

*stimulation and nerve growth factor treatment of cultured chromaffin cell, on neurite growth, noradrenaline release, excitable properties, and grafting in nigrostriatal lesioned rats*", Molecular and Cellular Neuroscience. 1994. 5(6):485-498 pp.

- ◆ Edwards A. V., 1982, "*Adrenal Catecholamine output in response to stimulation of the splanchnic nerve in bursts in the conscious calf*" Journal of Physiology 327: 409-419 pp.
- ◆ Edwards A. V., Furness P. N., Helle K. B., 1980 "*Adrenal medullary responses to stimulation of the splanchnic nerve in the conscious calf*" J Physiol 308: 15-27 pp.
- ◆ Edwards A. V., Jones C. T. 1993, "*Autonomic control of adrenal function*", Journal of Anatomy, 183: 291-307 pp.
- ◆ Fenwick E. M., Marty A., Neher E., 1982, "*A Patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine*", Journal of Physiology, 331: 577-597 pp.
- ◆ Fenwick E. M., Marty A., Neher E., 1982, "*Sodium and Calcium Channels in Bovine Chromaffin Cells*", Journal of Physiology, 331: 599-635 pp.
- ◆ Fulop T., Smith C., 2006, "*Physiological stimulation regulates the exocytic mode through calcium activation of protein kinase C in mouse chromaffin cells*", Biochemical Journal, 399: 111-119 pp.
- ◆ Fung M. M., Viveros O. H., O'Connor D. T., 2008. "*Diseases of adrenal medulla*" Acta Physiologica. 192: 325-235 pp.
- ◆ García A. G., García de Diego A. M., Gandia L., Borges R., García-Sancho J., 2006, "*Calcium Signalling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells*", Physiological Reviews 86: 1093-1131 pp.
- ◆ García-Fernández M., Mejías R., López-Barneo J., 2006, "*Developmental changes of chromaffin cell secretory response to hypoxia studied in thin adrenal slices*", Pflügers Archives of European Journal of Physiology, 454 (1): 93-100 pp.
- ◆ García-Palomero E., Cuchillo-Ibañez I., García A. G., Renart J., Albillos A., Montiel C., 2002, "*Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca<sup>2+</sup> channels, derived from mRNA identification studies*", Federation of European Biochemical Societies. 481: 235-239 pp.
- ◆ Glavinovic M. I., Vitale M. L., Trifaró J. M., 1998, "*Comparison of vesicular volume and quantal size in bovine chromaffin cells*", Neuroscience. 85 (3): 957-968 pp.

- ◆ Gut P., Huber K., Lohr J., Brühl B., Oberle S., Treier M., Ernsberger U., Kalchauer Ch., Unsicker K., 2006. “*Lack of an adrenal cortex in Sfl mutant mice is compatible with the generation and differentiation of chromaffin cells*”, *Development*. 132: 4611-4619 pp.
- ◆ Gwartz P. A., 2008, “*Teaching the interrelationship between stress, emotions, and cardiovascular risk using a classic paper by Walter Cannon*”. *ADV Physiol Educ* 32: 18-22 pp.
- ◆ Hernández-Hernández H., Cruces-Solis H., Elias-Viñas D., Verdugo-Díaz L., 2009, “*Neurite outgrowth on chromaffin cells applying extremely low frequency magnetic fields by permanent magnets*”, *Archives of Medical Research*. 40: 545-550 pp.
- ◆ Hernández-Guijo J. M., Carbelli V., García A. G., Carbone E., 1999, “*Voltage-independent autocrine modulation of L-type Channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells*”, *European Journal of Neuroscience*, 11: 3574-3584 pp.
- ◆ Hernández-Guijo J. M., Maneu-Flores V. E., Ruiz-Nuño A., Villarroya M., García A. G., Gandía L., 2001, “*Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca<sup>2+</sup> channels in chromaffin cells: role of mitochondria*”, *The Journal of Neuroscience* 21 (8): 2533-2560 pp.
- ◆ Hillarp N.Å, Hökfelt., 1954. “*Evidence of adrenaline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells*”, *Acta Physiologica Scandinavica*. 30: 55-68 pp.
- ◆ Huang W., Yan J., Chen X., Fan H., Guo N., Lü J., Xiu Y., Gu J., Zhang C. X., Ruan H., Hu Z., Yu Z., Zhou Z., 2008, *Neuroscience Letters*, 436 (2): 181-184 pp.
- ◆ Huber K., 2006, “*The Sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives*”, *Developmental Biology*, 298: 335-343 pp.
- ◆ Huber K., Combs S., Ernsberger U., Kalchauer C., Unsicker K., 2002, “*Generation of neuroendocrine chromaffin cells from sympathoadrenal progenitors: beyond the glucocorticoid hypothesis*”, *Annals of New York Academy of Science*, 971: 554-559 pp.
- ◆ Huber K., Karch N., Ernsberger U., Goridis C., Unsicker K., 2005, “*The role of Phox2B in chromaffin cell development*”, 279: 501-508 pp.

- ◆ Jansen A. S. P., Nguyen X. V., Karpitskiy V., Mettenleiter T. C., Loewy A. D., 1995, “*Central Command Neurons of the Sympathetic Nervous System: Basis of the Fight-or-Flight Response*”. *Science*. 270: 644-646 pp.
- ◆ Kalcheim C., Langley K., Unsicker K., 2002, “*From the neural crest to chromaffin cells- Introduction to a session on chromaffin cell development*”, *Annals of New York Academy of Science*. 971: 544-546 pp.
- ◆ Kim O., Lim G., Lim D., 2005, “*Influence of naloxone on catecholamine release evoked by nicotinic receptor stimulation in the isolated rat adrenal gland*”, *Archives of Pharmacology Research*, 6: 699-708 pp.
- ◆ Kobayashi S., Coupland R. E., 1993, “*Morphological aspects of chromaffin tissue: the differential fixation of adrenaline and noradrenaline*”, *Journal of Anatomy*, 183: 223-235 pp.
- ◆ Koval L.M., Yavorskaya E. N., Lukyanetz E.A., 2000, “*Ultrastructural features of medullary chromaffin Cell cultures*”, *Neuroscience*. 96: 639-649 pp.
- ◆ Martin A. O., Mathieu M., Chevillard C., Guérineau N., 2001, “*Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca<sup>2+</sup> increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release*”, *The Journal of Neuroscience*, 21 (15): 5397-5405 pp.
- ◆ Martin A. O., Mathieu M., Guérineau N., 2003, “*Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells*”, *The Journal of Neuroscience*, 23 (9): 3669-3678 pp.
- ◆ Miranda-Ferreira R., de Pascual R., Caricati-Neto A., Gandía L., Jurkiewicz A., García A. G., 2009, “*Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats*”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 329 (1): 231-240 pp.
- ◆ Moriguchi T., Takako N., Hamada M., Maeda A., Fujioka Y., Kuroha T., Huber R. E., Hasegawa S. L., Rao A., Yamamoto M., Takahashi S., Lim K., Douglas E. J., 2006, “*Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation*”, *Development*, 133: 3871-3881 pp.

- ◆ Moro M. A., García A. G., Langley O. K., 1991, “*Characterization of Two Chromaffin Cell Populations Isolated from Bovine Adrenal Medulla*”, *Journal of Neurochemistry*, 57: 363-369 pp.
- ◆ Moser T., Neher E., 1997, “*Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices*”, *The Journal of Neuroscience*, 17 (7): 2314-2323 pp.
- ◆ Murakami T., Oukouchi H., Uno Y., Ohtsuka A., Taguchi T., 1989. “*Blood Vascular Beds of Rat Adrenal and Accessory Adrenal Glands with Special Reference to the Corticomedullary Portal System: A Further Scanning Microscopic Study of Corrosion Casts and Tissue Specimens*”, *Archives of Histological Cytologie*. 52 (5):c461-476 pp.
- ◆ Nankova B. B., Sabban E. L., 1999, “*Multiple signaling pathways exist in the stress-triggered regulation of gene expression for catecholamine biosynthetic enzymes and several neuropeptides in the rat adrenal medulla*”, *Acta Physiologica Scandinava*, 176: 1-9 pp.
- ◆ Nassar-Gentina V., Pollard H. V., Rojas E., 1988, “*Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland*”, *American Journal of Physiology*, 254: C675-C683 pp.
- ◆ Olivos L., Artalejo A. R., 2008, “*Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells*”, *Acta Physiologica*, 192: 213-220 pp.
- ◆ Pearse A. G. E., 1968, “*Common Cytochemical and Ultrastructural Characteristics of Cells Producing Peptide Hormones (the APUD Series) and their Relevance to Thyroid and Ultimobranchial C Cells and Calcitonin*”. *Proceedings of the Royal Society Series B*. 170: 71-80 pp.
- ◆ Richelson E., 2003, “*Interactions of antidepressants with neurotransmitter transporters and receptors and their clinical relevance*”, *J Clinical Psychiatry*, 64 (13):5-12 pp.
- ◆ Sala F., Nistri A., Criado M., 2008, “*Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells*”, *Acta Physiologica*, 192: 203-212 pp.
- ◆ Santana F., Michelena P., Jaén R., García A. G., Borges R., 1999, “*Calcium channel subtypes and exocytosis in chromaffin cells: a different view from the intact adrenal gland*”, *Archives of Pharmacology*, 360: 33-37 pp.

- ◆ Sokolov V. I., Chumasov E. I., Atagimov M. Z., 2006, “*The histogenesis of interrenal primordium of the adrenal gland in pig (Sus domestica)*”, *Morfologiya* (Saint Petersburg, Russia), 129(3): 59-62 pp.
- ◆ Udenfriend S., Cooper J. R., Carroll T. C., Baer J. E., 1953, “*Rate of Turnover Epinephrine in the Adrenal Medulla*”, *Science*. 117: 663-665pp.
- ◆ Udenfriend S., Wyngarden J. B., 1956 “*Precursors of Adrenal Epinephrine and Norepinephrine in vivo*”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 20: 48-52 pp.
- ◆ Unsicker K., Huber K., Schütz G., Kalcheim C., 2005. “*The Chromaffin Cell and its Development*”, *Neurochemical Research*, 30: 921-925 pp.
- ◆ Verdugo-Díaz L., Olivares-Bañuelos T., Navarro L., Drucker-Colín R., 2002, “*Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Field Stimulation on Cultured Chromaffin Cells*”, *Annals of New York Academy of Science*, 971: 266-268 pp.
- ◆ Voets T., 2000, “*Dissection of three Ca<sup>2+</sup>-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices*”, *Neuron*, 28: 537-545 pp.
- ◆ White J. G., Amos W. B., Fordham M., 1987, “*An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy*”, *The Journal of Cell Biology*, 105: 41-48 pp.
- ◆ Wiegang U. K., Don-Wauchope A., Matskevich I., Duncan R. R., Greaves J., Shipston M. J., Apss D. K., Chow R. H., 2002, “*Exocytosis studies in a chromaffin cell-free system –Imaging of single-vesicle exocytosis in a chromaffin cell-free system using total internal reflection fluorescence microscopy*”, *Annals of New York Academy of Science*, 971: 257-261 pp.
- ◆ Wong D. L., Anderson L. J., Tai T., 2002, “*Cholinergic and peptidergic regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression*”, *Annals of New York Academy of Science*, 971:19-26 pp.
- ◆ Yamagami K., Moritoyo T., Wakamori M., Sorimachi M., 2002, “*Limited intercellular spreads of spontaneous Ca<sup>2+</sup> signals via gap junctions between chromaffin cells in situ*”, *Neuroscience Letters*, 323: 97-100 pp.

WORLD WIDE WEB (Internet):

- ◆ [http://www.bio-medicine.org/biology-dictionary/Adrenal\\_glands/](http://www.bio-medicine.org/biology-dictionary/Adrenal_glands/)