



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MODULACIÓN GABAérgica DE LAS SEÑALES DE CALCIO DE LAS CÉLULAS**  
**CROMAFINES DE GLÁNDULA ADRENAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**María Mildred Tzitzitlini Alejandre García**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**  
**DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR:**  
**DR. ERASMO DAVID GARCÍA DÍAZ**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**MÉXICO, D.F. mayo, 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**MODULACIÓN GABAérgica DE LAS SEÑALES DE CALCIO DE LAS CÉLULAS**  
**CROMAFINES DE GLÁNDULA ADRENAL**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**María Mildred Tzitzitlini Alejandre García**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**  
**DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**COMITÉ TUTOR:**  
**DR. ERASMO DAVID GARCÍA DÍAZ**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**MÉXICO, D.F. mayo, 2014**

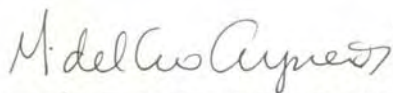
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria, celebrada el día 17 de febrero de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **ALEJANDRE GARCÍA MARÍA MILDRED TZITZITLINI** con número de cuenta **30229706-7** con la tesis "**Modulación GABAérgica de las señales de calcio de las células cromafines de glándula adrenal**", realizada bajo la dirección del **DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**.

Presidente: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO  
Vocal: DR. JOSÉ RODOLFO DELGADO LEZAMA  
Secretario: DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ  
Suplente: DRA. TATIANA FIORDELISIO COLL  
Suplente: DR. MIGUEL ANGEL MORALES MENDOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de abril de 2014.



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias por el apoyo otorgado a:

El posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de éste proyecto, con el número (CVU/Becario): 287725 / 269644 a partir de la fecha 30 de Enero del 2012 hasta el 29 de Enero del 2014.

El apoyo de los proyectos PICSA10-116 (ICyTDF) y DGAPA-PAPIIT IN222413.

Gracias por el apoyo otorgado a los miembros de mi comité tutor por el gran entusiasmo que mostraron en mi formación académica y por sus valiosas observaciones y sugerencias a este trabajo:

Dr. Arturo Hernández Cruz (Instituto de Fisiología Celular).

Dr. Erasmo David García Díaz (Facultad de Medicina).

Dr. José Bargas Díaz (Instituto de Fisiología Celular).

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Arturo Hernández cruz por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio. Además por su apoyo y sus aportaciones que hicieron posible concluir exitosamente este proyecto.

Al Dr. Pedro Chama Segura por su invaluable apoyo y guía durante mi formación académica.

A la Dra. Deisy Gasca Martínez por su tiempo y apoyo al instruirme técnicamente.

A la Dra. María Luisa Durán Pasten por su tiempo y paciencia al instruirme técnicamente.

Al Q.F.B. Nicolás Jiménez Pérez por su asistencia y apoyo técnico brindado dentro del laboratorio.

Al Ingeniero Jesús Pérez, por su paciencia y ayuda en el análisis con su programa fSIENN, con el que se analizaron algunos de los datos presentados en este trabajo.

Al Ingeniero Manuel Álvarez, por su ayuda en la elaboración de rutinas de MathLab, con las que se analizaron algunos de los datos presentados en este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Delgado por sus valiosas observaciones al proyecto.

A la Dra. Claudia Rivera Cerecedo directora del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Al Instituto de Fisiología Celular por las facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo.

A mis padres

Adelaida García Cortes y José Juan Alejandro González



# ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	1
1.1	Organización del sistema nervioso autónomo	2
1.2	Glándulas adrenales (Anatomía, morfología y fisiología)	2
1.3	Células Cromafines	3
1.4	Irrigación de las glándulas adrenales en humanos	4
1.5	Inervación nerviosa de las glándulas adrenales	5
1.6	Implicaciones fisiológicas de la liberación de catecolaminas al torrente	5
1.7	Liberación de las catecolaminas por exocitosis	6
<b>2</b>	<b>Antecedentes</b>	11
2.1	Señales dinámicas del calcio	11
2.2	Modulación de las señales de calcio por neurotransmisores	12
2.3	Sistema GABAérgico intrínseco de las células cromafines de la médula adrenal.	12
2.4	Regulación funcional de la actividad de las células cromafines por el GABA	14
<b>3</b>	<b>Hipótesis</b>	18
<b>4</b>	<b>Objetivo general</b>	18
4.1	Objetivos Particulares	18
<b>5</b>	<b>Métodos</b>	19
5.1	Obtención de rebanadas de glándula adrenal para registros <i>in vitro</i>	19
5.2	Imagenología de $Ca^{2+}_i$ en células cromafines de rebanada de glándula	20
5.3	Fármacos	21
5.4	Análisis de Imágenes	22
5.5	Registro electrofisiológico de potenciales de acción	24
5.6	Análisis de Datos	25
<b>6</b>	<b>Resultados</b>	26
6.1	Cambios en el $Ca^{2+}_i$ producidas por la estimulación de receptores $GABA_A$ en las células cromafines.	26
6.2	La activación de los receptores $GABA_A$ despolariza el potencial de membrana de las células cromafines.	29
6.3	El incremento del $Ca^{2+}_i$ por estimulación del receptor $GABA_A$ depende de la presencia de $Ca^{2+}$ extracelular.	30

6.4 Efectos de GABA endógeno en los transitorios de $\text{Ca}^{2+}_i$ en las células cromafines.	32
6.5 El incremento de los transitorios de $\text{Ca}^{2+}_i$ inducidas por el bloqueo de receptores $\text{GABA}_A$ es dependiente de la activación de receptores nicotínicos.	37
<b>7 Discusión</b>	42
<b>8 Conclusión</b>	47
<b>9 Bibliografía</b>	48

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Las células cromafines de la glándula adrenal liberan espontáneamente y por estimulación colinérgica catecolaminas conjuntamente con ácido gamma-aminobutírico (GABA) al torrente sanguíneo. Estas células expresan receptores GABA<sub>A</sub>. Los estudios de la activación del receptor GABA<sub>A</sub>, por aplicación exógena de sus agonistas específicos, en células cromafines en cultivo bajo estimulación colinérgica, han sido inconsistentes, sin embargo, los registros en condiciones basales coinciden en que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> induce un incremento del calcio intracelular (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>), sin embargo, la función del GABA endógeno en las células cromafines aun no está claro. Las rebanadas de glándula adrenal son una excelente preparación para evaluar el efecto de moléculas endógenas como GABA en el tejido ya que preserva mejor las condiciones del microambiente celular.

**OBJETIVO:** Evaluar los efectos de los agonistas del receptor GABA<sub>A</sub> y la actividad del GABA endógeno en las oscilaciones de calcio intracelular espontáneas e inducidas por estímulos colinérgicos en las células cromafines.

**MÉTODOS:** Para evaluar los cambios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> se utilizaron rebanadas de glándula adrenal, las cuales fueron obtenidas de ratas macho Wistar de 8 semanas de edad y después fueron incubadas durante 35 minutos con el indicador de Ca<sup>2+</sup> fluo-4 AM, para después colocarlas con perfusión constante de solución salina normal saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> en la cámara de registro de un microscopio vertical de epifluorescencia. Las secuencias de imágenes de las rebanadas fueron adquiridas con un objetivo 20X de inmersión en agua excitando al fluoróforo a 3 HZ durante 3 min (480 nm excitación / 540 nm de emisión; 15 ms de exposición), antes, durante y después de la aplicación de muscimol (20 μM), un agonista específico del receptor GABA<sub>A</sub>, bicuculina (50 μM), un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>, nicotina (10 μM) agonista receptores nicotínicos y mecamilamina (20 μM) antagonista de receptores nicotínicos. Los registros del potencial de membrana fueron obtenidos de varias células cromafines con la técnica de *patch-clamp* en configuración de *current-clamp* en la modalidad de parche perforado.

**RESULTADOS:** Se obtuvieron las señales de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> de células cromafines, con resolución de célula única y fueron analizadas. La aplicación de muscimol (20 μM), promovió el incremento del Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en el 42 ± 6% y el decremento en 8 ± 1% de las células cromafines, el 49 ± 5% restante no mostró una respuesta. El incremento de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducido por muscimol depende de la presencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular. 3 de 10 células cromafines registradas con la técnica de *patch-clamp*, mostraron una despolarización de aproximadamente 5 mV después de la aplicación de muscimol; la aplicación de Bicuculina, bloqueó el incremento del Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducido por muscimol. Para evaluar los efectos de la activación del receptor GABA<sub>A</sub> por el GABA endógeno, se examinaron las fluctuaciones espontáneas de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> durante la aplicación de bicuculina. Bicuculina promovió el incremento en frecuencia y amplitud de las oscilaciones de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en 54 ± 5% de las células cromafines, de las cuales 38 ± 2% habían incrementado el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en respuesta a muscimol y 16 ± 3% de las células que no mostraron respuesta a muscimol. El 46% de las células restantes no mostraron efecto. La aplicación de Mecamilamina, un antagonista selectivo de receptores nicotínicos, bloqueó el incremento en la frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducidos por la aplicación de bicuculina en las células cromafines.

**Conclusiones:** La activación de receptores GABA<sub>A</sub> por muscimol, induce el incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en casi el 50% de las células. La actividad espontánea o la falta de ella en las células no depende del incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en respuesta a la activación de receptores GABA<sub>A</sub>. Muscimol induce la despolarización del potencial de membrana en 3 de 10 células registradas. El incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en respuesta a la activación de receptores GABA<sub>A</sub> depende del Ca<sup>2+</sup> extracelular. La inhibición de los receptores GABA<sub>A</sub>, mostraron el efecto del GABA endógeno en la actividad del Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, la inhibición tónica de las señales de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducidas por estímulos colinérgicos, y por lo tanto la inhibición tónica de la secreción de catecolaminas.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Adrenal chromaffin cells release catecholamines, ATP, opioids and gamma-aminobutyric acid (GABA) spontaneously and upon cholinergic stimulation; interestingly, they express GABA<sub>A</sub> receptors. In cultured chromaffin cells the application of GABA<sub>A</sub> receptor agonists increases the intracellular calcium (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>); however, the functional role of endogenously released GABA in chromaffin cells *in situ* is unclear. Adrenal slices are an excellent preparation to evaluate the exerted effects by co-secreted products because they preserve the tissue structure of the adrenal gland.

**OBJECTIVE:** Characterize the effects of GABA<sub>A</sub> agonists and endogenously released GABA acting on GABA<sub>A</sub> receptors on intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in rat chromaffin cells in acute adrenal slices.

**METHODS:** Adrenal slices were obtained from male Wistar rats (8 weeks-old), incubated for 35 min with the Ca<sup>2+</sup> indicator fluo-4 AM to evaluate the changes of Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, and placed in a perfusion chamber on the stage of vertical fluorescence microscope with saline physiological solution gassed with 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>. Image sequences of the slices were acquired with a 20X water immersion objective, Fluo-4 was excited at 3 Hz (3 min; excitation 480 nm/ emission 540 nm; 15 ms exposure) before, during and after the application of muscimol 20 μM a GABA<sub>A</sub>-receptor agonist, bicuculline 50 μM a GABA<sub>A</sub> receptor antagonist, nicotine 10 μM a nicotine receptor agonist and mecamylamine 20 μM a nicotine receptor antagonist. Membrane potential recordings were obtained from several chromaffin cells with the perforated patch-clamp technique on current-clamp mode.

**RESULTS:** Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> levels from dozens of individual chromaffin cells were analyzed. Muscimol (20 μM), a GABA<sub>A</sub> receptor agonist produced a Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> increase in 42 ± 6% and a decrease in 8 ± 1% of chromaffin cells tested. The remaining 49 ± 5% showed no response. 7 out of 10 chromaffin cells tested showed no change in MP after muscimol and 3 cells were depolarized by about 5 mV. Bicuculline (50 μM), a selective GABA<sub>A</sub> antagonist blocked muscimol responses. Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> increases were dependent on the presence of external Ca<sup>2+</sup>. To evaluate the effect of GABA<sub>A</sub> receptor activation by endogenous GABA, spontaneous Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> fluctuations were examined during bicuculline application. Bicuculline increased frequency and amplitude of Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> fluctuations in 38 ± 2% of chromaffin cells showing Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> increased muscimol responses, also triggered spontaneous Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> oscillations in 16 ± 3% of muscimol not responsive cells. The remaining 46% of cells showed no effect. Mecamylamine application, a selective nicotine receptor antagonist, blocked bicuculline increased frequency and amplitude of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fluctuations of chromaffin cells.

**CONCLUSIONS:** These results show that ionotropic GABA<sub>A</sub> receptor activation induces Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> increases due to Ca<sup>2+</sup> influx in about 50% of adrenal chromaffin cells. MP depolarization was confirmed in 3 of 10 cells tested. Also, endogenously released GABA present in the adrenal medulla activates GABA<sub>A</sub> receptors and influences the generation of spontaneous Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> fluctuations in chromaffin cells, which presumably underlie basal catecholamine secretion.

# 1 Introducción

Las alteraciones somáticas que inician cuando nos encontramos ante situaciones de peligro, como el aumento la frecuencia cardiaca, la respiración rápida, la boca seca, los músculos tensos, están regulados a nivel del sistema nervioso central por el hipotálamo. El cual, al actuar sobre el Sistema Nervioso Autónomo coordina las respuestas fisiológicas en un organismo para mantener el medio interno estable, tanto en condiciones de reposo como en respuesta al estrés, regulación por retroacción (Cannon, 1929).

La idea de un medio interno estable ante condiciones externas cambiantes fue propuesta por el fisiólogo francés Claude Bernard. Canon, propuso el concepto de homeostasis como el conjunto de mecanismos fisiológicos complejos que mantienen el medio interno estable en su libro “the windsom of the body” de 1932, donde hizo un bosquejo de nuestro conocimiento actual sobre el sistema nervioso autónomo:

“Si un estado fisiológico permanece en equilibrio, se debe a que cualquier cambio es afrontado de inmediato por el factor o los factores que se oponen al cambio”

El Sistema Nervioso Autónomo, también conocido como el sistema motor involuntario, está separado en tres divisiones: simpática, parasimpática y entérica. Las divisiones simpática y parasimpática inervan el músculo cardíaco, el músculo liso y tejidos glandulares, y regulan diversos reflejos viscerales. El fisiólogo W.B. Cannon fue el primero en proponer que las divisiones simpáticas y parasimpáticas tienen funciones diferentes. Cannon sostuvo que el sistema parasimpático contribuye a mantener el reposo y la digestión, manteniendo la frecuencia cardiaca, la respiración y el metabolismo en condiciones normales. Por otra parte, cuando el cuerpo necesita responder a cambios repentinos en el medio interno o externo, sea estrés emocional, el combate, la variación intensa de la temperatura o una hemorragia, domina el sistema simpático y se activan las reacciones de emergencia o las respuestas de lucha o huida que se caracterizan por aumentar la estimulación al corazón, los vasos periféricos, las glándulas sudoríparas, los músculos erectores del pelo y ciertos músculos oculares.

Existe una estrecha relación entre los sistemas simpático y parasimpático esto quiere decir que no son independientes uno del otro, ambos están tónicamente activos y operan conjuntamente entre sí; los efectos opuestos que ejercen sobre los

tejidos inervados, dan como resultado la estabilidad del medio interno ante las condiciones externas cambiantes, es decir, regulan la homeostasis (Kandel *et al.*, 2000).

### **1.1 Organización del sistema nervioso autónomo**

Las neuronas finales de las vías autonómicas se extienden más allá de la médula espinal, están formados por un circuito de neuronas: las primeras neuronas, cuyo soma se encuentra en el encéfalo o en la médula espinal (astas laterales de la sustancia gris) son conocidas como neuronas preganglionares, las cuales proyectan su axón hasta un ganglio autónomo donde hacen sinapsis con las segundas neuronas de la vía autónoma, denominadas neuronas posganglionares, mismas que proyectan hasta los órganos efectores (Kandel *et al.*, 2000).

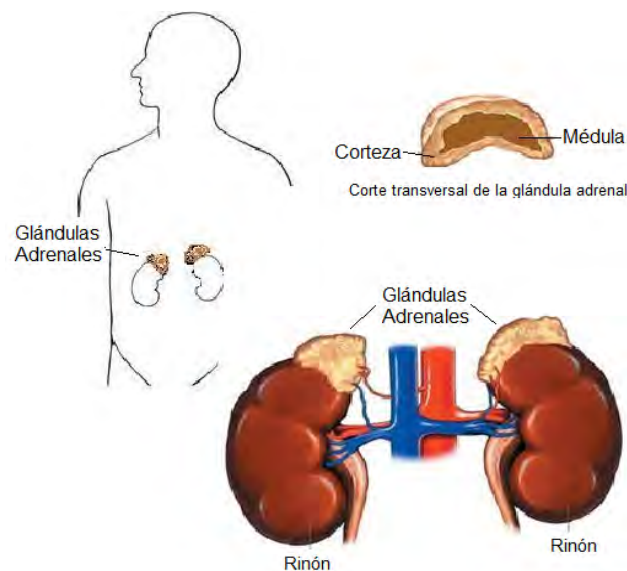
Una de las glándulas que recibe inervación de la división simpática del Sistema Nervioso Autónomo es la glándula adrenal. En este caso las neuronas preganglionares inervan directamente a las células de la médula adrenal (consideradas como neuronas posganglionares modificadas). A la unidad formada por estos dos componentes se le denomina “eje simpato-adrenal”. La actividad de este eje en condiciones normales, determina el tono simpático y durante un estrés agudo incrementa su actividad hasta 30 veces, esto contribuye a mantener la homeostasis corporal del organismo tanto en condiciones de reposo como durante la exposición a estímulos extremos (Landsberg y Young, 1980).

### **1.2 Glándulas adrenales (Anatomía, morfología y fisiología)**

Las glándulas adrenales son dos órganos endocrinos, pequeñas estructuras situadas sobre la parte superior de cada riñón, las cuales tiene una forma piramidal (Fig. 1); y fueron descritas por primera vez en 1563 por Bartholomeo Eustachius como la “Glandulae renis incumbentes”. Las glándulas se encuentran recubiertas por tejido adiposo y una cápsula de tejido conectivo que las mantiene adheridas al riñón y se caracterizan por presentar una gran vascularización (Coupland, 1965). En los mamíferos, las glándulas se componen de dos partes diferenciadas anatómicamente y funcionalmente, la corteza y la médula (Schoenwetter *et al.*, 1968); estas estructuras tienen un origen embrionario diferente.

La corteza de la glándula adrenal tiene un origen embrionario mesodérmico, mientras que la médula tiene un origen embrionario neuroectodérmico. La médula

proviene de la cresta neural y funciona como un tejido nervioso especializado en la secreción (Huber *et al.*, 2009). Rudolph Albert y Kölliker en 1961 describieron la formación embrionaria de la glándula adrenal donde primero se forma la corteza y es subsecuentemente invadida por las células de la médula (Le Douarin y Teillet, 1974; Teillet y Le Douarin, 1974), a estas células se les denomina células cromafines (Coupland, 1965).



**FIGURA 1.** Ilustración de la ubicación anatómica y morfología de la glándula adrenal.

### 1.3 Células Cromafines

Las células cromafines (del griego *chroma* = color y del latín *affinis* = afín), se denominaron así por la alta afinidad que tienen sus gránulos para teñirse con sales de cromo como el dicromato de potasio (Kohn, 1902), en el tejido las células se disponen en grupos arreglados en cordones conectados que rodean estructuras vasculares. Estas células sintetizan, almacenan y secretan catecolaminas (principalmente adrenalina y en menor proporción noradrenalina) (Perlman, 1977).

En la médula adrenal se distinguen células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas (Eränkö, 1952), la diferencia entre ellas se encuentra en función del tipo de catecolamina que secretan: las células adrenérgicas constituyen hasta el 80 o 90% del total de las células, el resto corresponde a células noradrenérgicas. La diferencia bioquímica entre estos dos tipos celulares está dada por la presencia de una enzima adicional en las células adrenérgicas, denominada feniletanolamina

N-metil transferasa (PNMT) por sus siglas en inglés (Coupland, 1972), que transforma la noradrenalina en adrenalina.

En 1973 Blaschko y Welch encontraron que las catecolaminas se localizan predominantemente en una fracción particular del homogenizado adrenomedular, los gránulos cromafines. Los gránulos cromafines constituyen los organelos más representativos y abundantes en las células cromafines, es ahí donde se almacenan los productos de secreción para después ser secretados. El proceso mediante el cual se produce la secreción de catecolaminas es la exocitosis, el contenido vesicular es liberado al espacio extracelular e inmediatamente alcanza el torrente sanguíneo a través del cual llega a su órgano blanco, por lo que se considera que los contenidos vesiculares de las células cromafines funcionan como hormonas (Bernard, 1855; Schäfer, 1895).

#### **1.4 Irrigación de las glándulas adrenales en humanos**

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

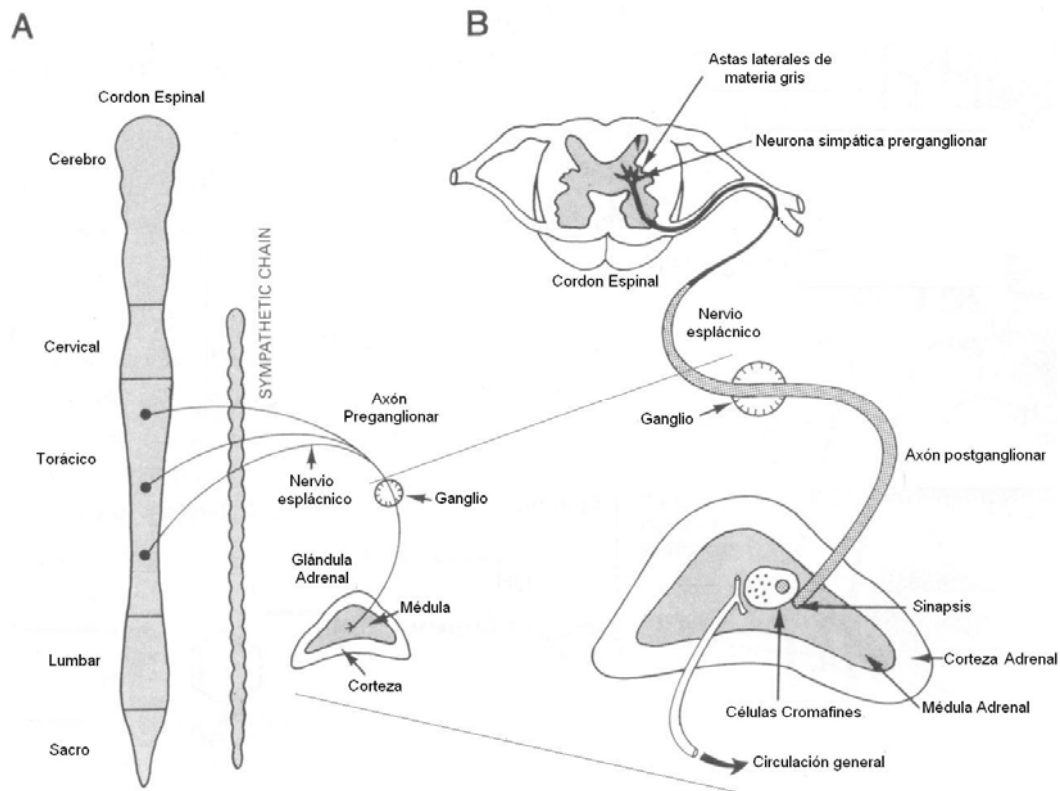
Este sistema de vascularización permite la llegada de sustancias secretadas por la corteza a la médula adrenal, por ejemplo, los glucocorticoides provenientes de la corteza en concentraciones elevadas, favorecen la síntesis de la enzima PNMT en la células cromafines (Wurtman, 1966); por lo tanto la capacidad de síntesis de adrenalina en células de la médula adrenal, se beneficia de los eventos que ocurren en la corteza (Lockhart *et al.*, 1988).

#### **1.5 Inervación nerviosa de las glándulas adrenales**

En relación con su tamaño, las glándulas adrenales presentan una gran inervación nerviosa (Verdugo, 2005). Los axones que inervan a las células cromafines emergen de las neuronas preganglionares, cuyo soma se encuentra en la médula espinal y su axón (el nervio esplácnico) emerge de las astas laterales entre los segmentos torácico 3 y lumbar 3, (Coupland, 1972) (Fig. 2). Las neuronas preganglionares que



inervan a las células cromafines liberan acetilcolina (ACh) como neurotransmisor químico, el cual estimula la liberación de catecolaminas de las células cromafines a la circulación sanguínea (Douglas, 1968).



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

### 1.6 Implicaciones fisiológicas de la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo

Durante situaciones de estrés físico o emocional, las células cromafines incrementan la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo, las cuales inician eventos que culminan con una respuesta fisiológica característica, como las conductas de lucha o huida. Las catecolaminas liberadas circulan por todo el cuerpo y tienen efecto en todos aquellos tejidos que expresan receptores denominados adrenérgicos, de los cuales Ahlquist en 1948 caracterizó y diferenció las respuestas de los dos tipos de receptores adrenérgicos: receptores alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ). Algunos de los principales efectos que induce la activación de estos receptores son: efectos contráctiles sobre el músculo liso, en especial en el músculo vascular por la activación del receptor

adrenérgico  $\alpha_1$ ; control presináptico de la liberación de noradrenalina, ACh y ATP de las terminales nerviosas simpáticas por activación del receptor  $\alpha_2$ ; y efectos estimulantes en el corazón ( $\beta_1$ ). Estas familias de receptores son blancos terapéuticos de diferentes fármacos de importancia médica como el tratamiento de hipertensión, el tratamiento de la eyaculación precoz o los broncodilatadores para pacientes con asma (Heinsimer y Lefkowitz, 1982; Pollet y Levey, 1980; Insel, 1984).

El sistema de control y eliminación de las catecolaminas se lleva a cabo en los diferentes compartimientos celulares en cuestión de minutos por mecanismos de recaptura, o son degradadas por oxidasas de monoaminas (MAO por sus siglas en inglés) o por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Tipton, 1973). Este mecanismo de degradación ha sido interpretado como una protección del organismo frente a una liberación excesiva de catecolaminas que puede ser potencialmente letal (Verdugo, 2005).

### **1.7 Liberación de las catecolaminas por exocitosis**

El acople entre el estímulo y la secreción de las células cromafines se adapta continuamente para garantizar la adecuada secreción de catecolaminas a demandas que difieren considerablemente de condiciones basales a condiciones de estrés (Guérineau et al., 2012).

En todas las células endocrinas, los pasos para la secreción de hormonas son regulados en respuesta a un aumento en la concentración de calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ), fisiológicamente la estimulación genera una elevación súbita de 0.1 - 50  $\mu\text{M}$  (transitorio de  $\text{Ca}^{2+}_i$ ), la cual depende de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares y de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales en la membrana celular (Schlegel y Mollard, 1995; Antonio García, 2006). Este incremento en la concentración  $\text{Ca}^{2+}_i$  induce la aceleración del transporte a través del citoesqueleto de los gránulos cromafines distribuidos en microdominios inmediatos a la membrana (Trifaró, 1985), promoviendo la fusión de dichos gránulos a la membrana plasmática para liberar sus contenidos (Landsberg, 1976; Becherer *et al.*, 2003).

Está reportado que debido a las propiedades eléctricas y endocrinas de las células cromafines, aproximadamente 65% de ellas presentan transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , típicamente originados y mantenidos por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares por la vía de generación de inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ), el

cual activa receptores de IP<sub>3</sub> del retículo endoplasmático, uno de los principales reservorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, que permiten la salida del Ca<sup>2+</sup> al citosol. Además pueden ser inducidos y sostenidos por las mismas señales de calcio, esto es conocido como la liberación de calcio inducida por calcio (CICR, por sus siglas en inglés) y es regulado principalmente por receptores de rianodina (RYR) en el retículo endoplasmático (Malgaroli *et al.*, 1990). Otras evidencias muestran que los transitorios espontáneos de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> también dependen del flujo de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV) (Micheletti *et al.*, 2005). Estos diferentes factores mantiene la actividad espontánea y pueden contribuir a la liberación basal de catecolaminas en las células cromafines, lo cual es un importante parámetro de la adecuada función de la médula adrenal (Petrovic *et al.*, 2010).

La activación de receptores colinérgicos en las células cromafines por la ACh liberada de las terminales nerviosas del nervio esplácnico, es el estímulo fisiológico que induce y coordina la liberación de catecolaminas de las células cromafines (Yoshimasa *et al.*, 1982; Viveros *et al.*, 1982; Millhorn y Hokfelt, 1988; Burnstock, 1987; Douglas, 1968).

Fisiológicamente el incremento del Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> y en consecuencia la exocitosis de catecolaminas en las células cromafines es inducida por la acción que ejerce la ACh a través de dos tipos de receptores: uno de tipo muscarínico (mAChR) y otro nicotínico (nAChR).

Los mAChR son receptores transmembranales acoplados a proteínas G. Se ha reportado que el efecto de la activación de este receptor en las células cromafines de médula adrenal de rata varían dependiendo del tipo de receptor muscarínico; M2, M3, M4 y M5 (Harada, *et al.*, 2011). Entre los principales efectos de la activación de estos receptores se encuentran: la regulación de la adenilato ciclasa, la cual podría fosforilar vías de activación que promuevan cambios en las corrientes de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales de calcio sensibles a voltaje (Vandael, *et al.*, 2012); la producción de IP<sub>3</sub>, el cual activa receptores de IP<sub>3</sub> del retículo endoplasmático, favorece el incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (Forsberg, *et al.*, 1986); además, se ha reportado que la estimulación de receptores muscarínicos inhiben de canales rectificantes de potasio (Bayliss, *et al.*, 2003), esto induce la despolarización del potencial de membrana de las células y consecuentemente la activación de CCSVs

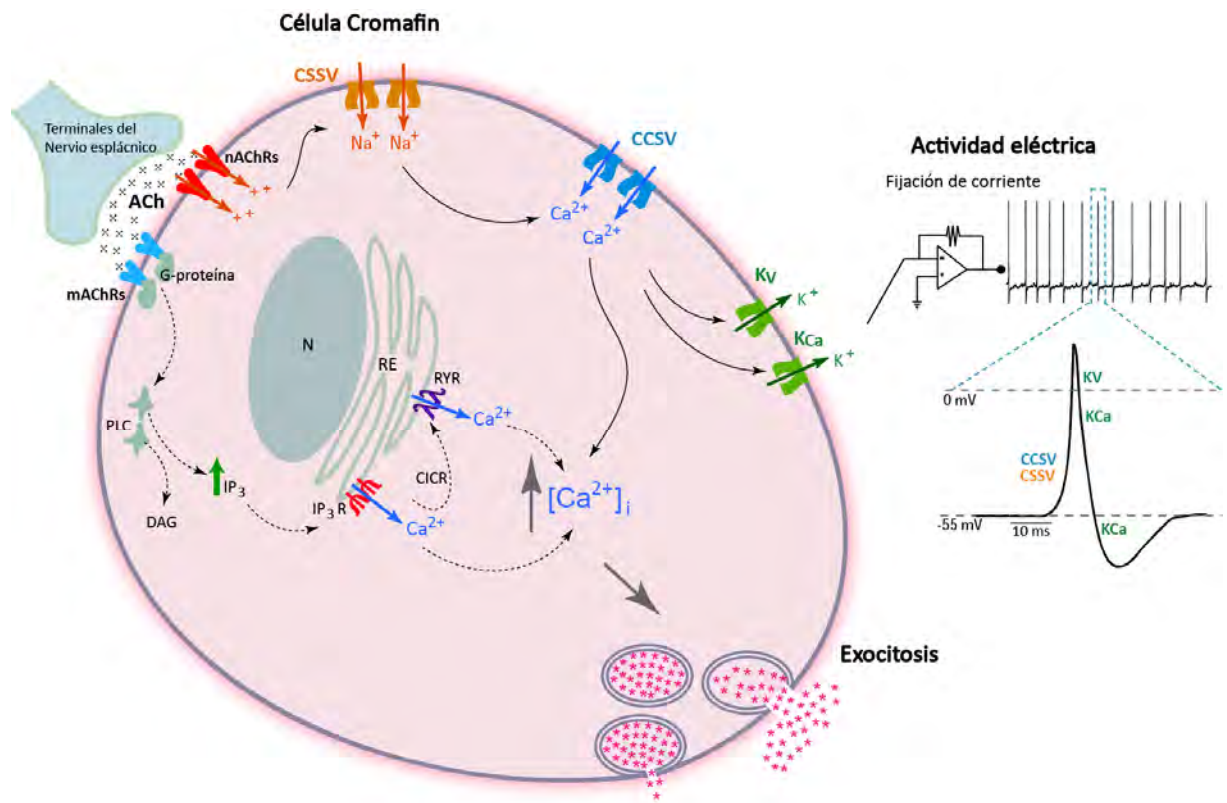
(Inoue, *et al.*, 2008). Por lo tanto, la activación de receptores muscarínicos, promueven el aumento en la concentración  $Ca^{2+}_i$  (Douglas, 1965; Douglas y Rubin, 1961; Fig. 3).

Por otra parte los nAChR son receptores catiónicos no selectivos, al ser activados por la ACh permiten el paso de iones  $Na^+$ ,  $K^+$  y escasamente  $Ca^{2+}$  (Fenwick *et al.*, 1982; Zhou y Neher, 1993), lo cual modifica el potencial de reposo e induce la generación de potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSP, por sus siglas en inglés) (Douglas, 1968).

Todas las células conservan un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, que en reposo es negativo del lado citosólico con respecto del medio extracelular. En células excitables como las células cromafines, esta diferencia en la distribución de cargas eléctricas se pueden modificar rápidamente, permitiendo a las células generar actividad eléctrica espontánea o en respuesta a un estímulo. En estos casos, los iones fluyen de un lado a otro de la membrana celular a través de poros proteicos llamados canales iónicos que atraviesan la membrana, los cambios en la permeabilidad de la membrana a estos iones pueden ser suficientes para inducir la secreción de hormonas y otros neurotransmisores de las células cromafines (Douglas, 1968).

Las células cromafines expresan diferentes tipos de canales iónicos, entre ellos, canales de sodio ( $Na^+$ ), potasio ( $K^+$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ). Debido a sus similitudes estructurales y funcionales, principalmente por la característica de ser sensibles al voltaje, se agrupan en la superfamilia de canales dependientes de voltaje (Hille, 2001), estos canales son activados durante la despolarización del potencial de membrana de una célula cromafin inducida durante la actividad espontánea o por la estimulación presináptica colinérgica (la activación de los nAChR y de los mAChR), que en reposo se encuentra alrededor de -60 y -40 mV. Si la magnitud de los eventos que inducen la despolarización, como la generación de EPSP inducidos por la activación de los nAChR, activa canales de  $Na^+$  sensibles a voltaje (CSSV), se alcanza el umbral de disparo del potencial de acción entre -40 y -30 mV, entonces se induce la generación de uno o más potenciales de acción (Douglas, 1968; Artalejo, 1995; Hollins, e Ikeda, 1996). Durante los potenciales de acción, se activan los canales de calcio sensibles a voltaje de alto umbral de activación (L, N, P, Q); en

esta fase del potencial, se controla el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula, el cual es un proceso decisivo para que se lleve a cabo la fusión de los gránulos de secreción con la membrana y promover así la exocitosis (Fig.3).



**FIGURA 3.** Representación de la exocitosis en la célula cromafín, inducida por el incremento en la concentración de calcio intracelular promovido por la estimulación colinérgica (Datos obtenidos por Segura Chama, 2014).

La repolarización se da cuando los canales de  $\text{Na}^+$  se inactivan, mientras que la despolarización activa gradualmente a los canales de  $\text{K}^+$  sensibles a voltaje mientras que el  $\text{Ca}^{2+}$  que entró a la célula, activa la corriente de  $\text{K}^+$  activada por  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo BK (Lingle *et al.*, 1996). La hiperpolarización depende de la activación de los canales BK y de los SK (Canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$ ); los canales SK presentan mayor sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  con respecto a los BK (Schlegel y Mollard, 1995).

## 2 Antecedentes

Las células cromafines han sido un modelo exitoso para el estudio de la correlación entre el  $\text{Ca}^{2+}$  como señal de activación y la exocitosis (Neher, 1998). Uno de esos factores, es que a diferencia de otras células neuroendocrinas, las células cromafines pueden ser obtenidas fácilmente en poblaciones relativamente puras (Fenwick, *et al.*, 1978). Y al igual que otras células neuroendocrinas, las células cromafines tienen todos los elementos requeridos para controlar espacialmente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}_i$  y posteriormente removerlo en rangos temporales muy específicos adaptándose continuamente a los estímulos tanto internos como extracelulares para el adecuado proceso de exocitosis (Burgoyne y Morgan, 2003).

### 2.1 Señales dinámicas del calcio

En la mayoría de las células excitables, durante un potencial de acción, el flujo de iones a través de los canales iónicos, no provoca cambios importantes en las concentraciones intracelulares de la mayoría de los iones. El  $\text{Ca}^{2+}$  es una excepción, la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}_i$  es muy baja, aproximadamente  $10^{-7}$  M, cuatro órdenes de magnitud por debajo de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , que es de aproximadamente  $10^{-3}$  M. Por lo tanto, los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}_i$  dan lugar a señales que operan en un rango muy específico y tienen gran influencia en la regulación de eventos celulares como la exocitosis (Kandel *et al.*, 2000).

Los sistemas de señalización de calcio generan breves incrementos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ . Estos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$  son creados por variaciones en las reacciones “On”/“Off”. Durante las reacciones “On” un estímulo induce un aumento de  $\text{Ca}^{2+}_i$  por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales y la formación de segundos mensajeros que liberan el  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo endoplasmático. Durante las reacciones “Off”, el  $\text{Ca}^{2+}$  es removido del medio intracelular mediante bombas e intercambiadores (Berridge *et al.*, 2003).

Una vez desencadenadas las reacciones “On” y “Off”, pueden ser reguladas por varios y diferentes mecanismos que facilitan una respuesta adecuada al estímulo fisiológico o ayudan a mantener la homeostasis celular (Borle, 1981), estos mecanismos pueden ser regulados por diferentes sustancias extracelulares (neurotransmisores).

## **2.2 Modulación de las señales de calcio por neurotransmisores autoliberados**

Dunlap y Fischbach en 1981 demostraron que en las células cromafines la aplicación exógena de distintos neurotransmisores modifican la concentración de  $Ca^{2+}_i$ , principalmente neurotransmisores que son co-liberados con las catecolaminas, como neuropeptidos opioides (encefalinas), purinas (ATP), dopamina-beta-hidroxilasa (DBH) y cromograninas (Viveros *et al.*, 1982; Winkler y Westhead, 1980). Esto se debe a que las células cromafines expresan diferentes tipos de receptores y su activación por distintos agonistas autócrinos y/o parácrinos, desencadena múltiples vías de señalización intracelular que regulan el incremento de  $Ca^{2+}_i$  (Albillos *et al.*, 1996a, 1996b). Estos moduladores afectan principalmente la probabilidad de apertura de canales de calcio en la membrana plasmática (Hille, 1992; García y Carbone, 1996; Carbone y García, 1996). Esto incluye la disminución de la corriente de calcio que fluye a través de los canales de calcio, por la activación de receptores dopaminérgicos  $D_2$  (Bigornia *et al.*, 1990), receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , receptores opioidérgicos y purinérgicos (Kleppisch *et al.*, 1992; Twitchell y Rane, 1993). También se incluye el incremento de  $Ca^{2+}_i$  que induce la estimulación de receptores GABAérgicos ( $GABA_A$  y  $GABA_B$ ) en las células cromafines (Bormann y Clapham, 1985, Castro *et al.*, 1988, 1989).

Estudios inmunohistoquímicos, electrofisiológicos y farmacológicos recientes, sugieren que la regulación de la secreción de catecolaminas de las células cromafines, podría estar modulada por el ácido gamma aminobutírico (GABA) a través de la activación de receptores  $GABA_A$  y  $GABA_B$ , sin embargo la función del sistema GABAérgico en la médula adrenal es controversial, ya que la activación de receptores  $GABA_A$  y  $GABA_B$  en las células cromafines por diferentes grupos de investigación han mostrado diferentes efectos en las señales de  $Ca^{2+}_i$  (Kataoka *et al.*, 1986; Matsuoka *et al.*, 2008; Kitayama *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 2003).

## **2.3 Sistema GABAérgico intrínseco de las células cromafines de la médula adrenal.**

GABA es un neurotransmisor típicamente inhibitorio en el sistema nervioso central. En el cerebro es sintetizado a partir de glutamato por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). Los efectos del GABA han sido ampliamente estudiados en

diferentes tipos neuronales. El GABA se ha encontrado en muchos tejidos y órganos periféricos, incluyendo la médula adrenal (Martin del Rio y Caballero, 1980). En 1986, Kataoka y colaboradores demostraron que las células cromafines de la médula adrenal en cultivo primario son inmunorreactivas al anticuerpo anti-GAD. Por lo tanto, estos autores sugieren que GABA es sintetizado y almacenado en los gránulos de las células cromafines (Harada, 2010), y por lo tanto, podría ser secretado por exocitosis en respuesta a estimulación fisiológica colinérgica (Oset-Gasque *et al.*, 1990) o durante la actividad espontánea.

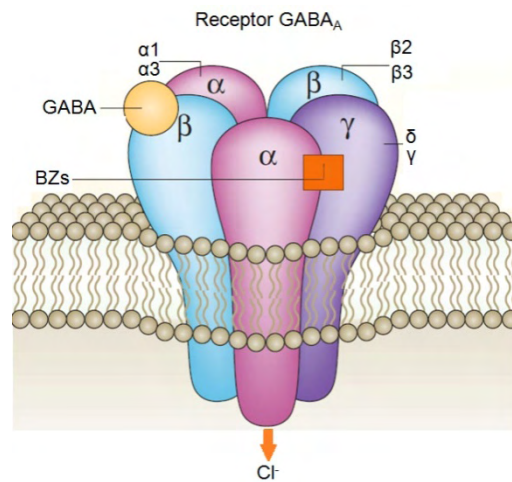
Por otra parte, se ha reportado la presencia de la enzima GAD en estructuras que parecen fibras nerviosas en la médula adrenal de perro (Kataoka *et al.*, 1986). Resultados similares se han reportado en médula adrenal de ratón (Oomorí *et al.*, 2013). Contrariamente, Matsuoka y colaboradores en el 2008 reportaron la presencia de la enzima específica responsable de la producción de GABA, GAD67 en células cromafines de rata, pero no en las fibras nerviosas.

Una vez que la síntesis del GABA en las células cromafines fuera reportada, se exploraron las respuestas celulares al GABA por medio de la técnica de *Patch Clamp*, se registraron corrientes de Cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) inducidas por la aplicación del GABA. Esta corriente fue bloqueada por la aplicación del antagonista específico de los receptores  $\text{GABA}_A$ , bicuculina (Bormann y Clampham, 1985). Estos datos confirmaron la expresión de receptores  $\text{GABA}_A$  funcionales en las células cromafines.

El receptor  $\text{GABA}_A$  es un complejo proteico pentamérico (Barnard *et al.*, 1998) que forma un canal ionotrópico selectivo a  $\text{Cl}^-$ . En las células cromafines las subunidades que constituyen a este receptor fueron identificadas por medio de mRNA, y a nivel de proteína se detectaron las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 2 / \beta 3$ ,  $\gamma 2$  y  $\delta$  (Matsuoka *et al.*, 2008, Fig. 4). La expresión de este tipo de subunidades sugiere propiedades farmacológicas específicas del receptor, como la facilitación por regulación alostérica inducida por diazepam (Bormann y Clampham, 1985), así como una alta afinidad del receptor al GABA y a un neuroesteroide como la allopregnanolona (Peters, *et al.*, 1989; Belelli y Lambert 2005), que puede ser liberado de la zona reticularis de la corteza adrenal (Holzbaurer *et al.*, 1985). Por otra parte, el tipo de subunidades que conforman a estos receptores puede ser determinante para su posible ubicación, ya sea sináptica por el contenido de



subunidades  $\alpha 1$  y  $\gamma$ , o extrasináptica por la presencia de subunidades  $\delta$ . Esto sugiere posibles funciones sinápticas y/o extrasinápticas del receptor GABA<sub>A</sub> en las células cromafines (Nusser *et al.* 1998; Farrant y Nusser, 2005).



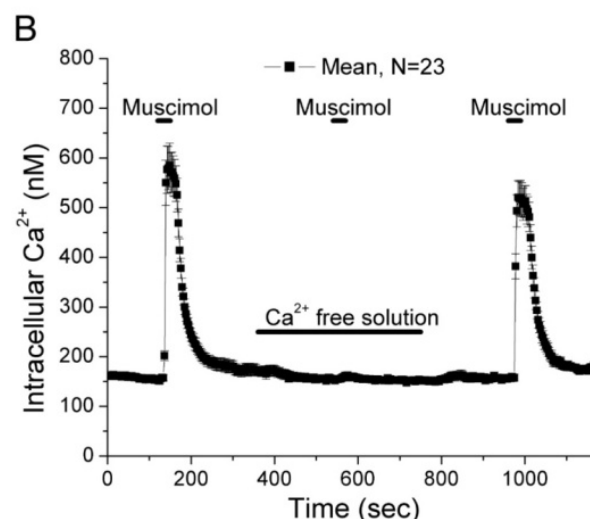
**FIGURA 4.** Receptor GABA<sub>A</sub> con las subunidades que lo constituyen en las células cromafines (Modificada de Jacob *et al.*, 2008)

## 2.4 Regulación funcional de la actividad de las células cromafines por el GABA

Aunque la activación de receptores GABA<sub>A</sub> en neuronas de organismos adultos induce principalmente hiperpolarización (inhibición), en neuronas de organismos inmaduros puede inducir despolarización (excitación; Staley *et al.*, 1996). Esto se debe a que los efectos de GABA sobre el receptor GABA<sub>A</sub> están determinados por la fuerza impulsora del Cl<sup>-</sup> generada por el gradiente transmembranal de Cl<sup>-</sup> y su diferencia de potencial (potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup>, E<sub>Cl</sub>) (Staley *et al.*, 1996). En neuronas inmaduras del sistema nervioso central así como en algunas células maduras como: las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1988) neuronas magnocelulares del hipotálamo (Kim *et al.*, 2011), neuronas del núcleo supraquiasmático (Choi, *et al.*, 2008), y en las células cromafines, la activación de receptores GABA<sub>A</sub> induce una *despolarización* debido a que el E<sub>Cl</sub> es menos negativo que el potencial de reposo de la membrana. Para el caso de las células cromafines el potencial de reposo de la membrana se encuentra entre -60 y -40 mV y el E<sub>Cl</sub> se ha reportado que es de -28 mV (Xie *et al.*, 2003). Esto indica que la concentración de Cl<sub>i</sub> en estas células, es mayor con respecto a otras neuronas donde la activación del receptor GABA<sub>A</sub> promueve una hiperpolarización y por tanto una inhibición (Ben-Ari, 2002).

La acumulación intracelular de iones  $\text{Cl}^-$  en neuronas inmaduras, es generada por la actividad de dos diferentes miembros de la familia de co-transportadores, uno de ellos, el co-transportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (NKCCs), cuyo transporte de  $\text{Cl}^-$  al interior de la célula es impulsado por los gradientes de concentración del sodio y potasio. Así como la escasa expresión del segundo co-transportador  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (KCC2), el cual, en neuronas maduras disminuye la concentración de  $\text{Cl}^-_i$  (Ben-Ari, 2002). Al igual que en células inmaduras, en las células cromafines se ha encontrado la expresión a nivel de proteína del co-transportador NKCC1 y una escasa o nula expresión del co-transportador  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (KCC2; Xie *et al.*, 2003). Estos dos factores en conjunto, podrían ser los responsables de la mayor concentración de  $\text{Cl}^-_i$ , lo que podría explicar porqué la activación del receptor  $\text{GABA}_A$  induce una despolarización en las células cromafines.

Las propiedades mencionadas anteriormente pueden explicar la generación de potenciales de acción (Peters *et al.*, 1989), así como el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}_i$  por la activación de canales de calcio sensibles a voltaje que induce la estimulación del receptor  $\text{GABA}_A$  en las células cromafines (Xie *et al.*, 2003, Fig. 5). Por lo tanto, el GABA facilita la secreción de catecolaminas de las células cromafines (Sangiah *et al.*, 1974), estos resultados han sido confirmados por otros grupos de investigación (Kataoka *et al.*, 1984; Kitayama *et al.*, 1984; Gonzales *et al.*, 1992).



**FIGURA 5.** Expresión funcional de receptores  $\text{GABA}_A$  en células cromafines. Muscimol (agonista de receptores  $\text{GABA}_A$ ) incrementa la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en células cromafines de bovino. Este efecto es dependiente del calcio extracelular (Xie *et al.*, 2003)

En células cromafines de varias especies la estimulación de receptores GABA<sub>A</sub>, por aplicación del GABA o muscimol (agonista específico de GABA<sub>A</sub>), resulta consistentemente en un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> y consecuentemente en un incremento en la secreción de catecolaminas. Sin embargo, aún es controversial si el GABA endógeno regula estos procesos durante la estimulación por el nervio esplácnico o por secretagogos. Ya que se ha reportado que la estimulación de los receptores GABA<sub>A</sub> inhibe la secreción de catecolaminas inducida por la activación el nervio esplácnico (Kataoka *et al.*, 1986; Matsuoka *et al.*, 2008), o la facilita (Kitayama *et al.*, 1990), o no tiene ningún efecto (Xie *et al.*, 2003). Aún no está claro si estas diferencias se deben al uso de diferentes especies o a los parámetros de estimulación eléctrica o farmacológica utilizados en cada uno de los casos.

La discrepancia en los resultados de diferentes grupos de trabajo, acerca del efecto de la estimulación de los receptores GABA<sub>A</sub> en la concentración de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> y la exocitosis de catecolaminas, dificulta llegar a un consenso que pueda explicar y predecir los efectos de la activación del receptor GABA<sub>A</sub> por el GABA proveniente de las células cromafines de la médula adrenal en el tejido intacto, el GABA endógeno. Y menos aun, las implicaciones fisiológicas de la presencia del sistema GABAérgico en las células cromafines de la glándula adrenal.

Se considera que las acciones del GABA endógeno en la glándula adrenal podría tener una función diferente a la que se ha reportado en neuronas del sistema nervioso central (Inoue *et al.*, 2011). En las células gliales del sistema nervioso central se encuentra una enzima responsable de la degradación de GABA, la GABA transaminasa (GABA-T; Owens y Kriegstein, 2002). Su inhibición induce un incremento en la concentración extracelular del GABA (Caron *et al.*, 1988). Además, se encuentran los transportadores de GABA (GATs; Matsuoka *et al.*, 2008) que se encargan de la recaptura del GABA desde el espacio sináptico. Se ha reportado que en las células cromafines no hay actividad de GABA-T, ni presencia de GAT (Matsuoka *et al.*, 2008), por lo tanto, en estas células no operan los mecanismos que regulan la concentración del GABA del medio extracelular como en el sistema nervioso. Esta condición podría favorecer la difusión del GABA extracelular, así como una mayor influencia del GABA endógeno sobre el tejido adrenal.

Debido a que el GABA endógeno puede liberarse de las células cromafines y que además, la ausencia de GATs y GABA-T permitiría una mayor difusión y efectos del GABA extracelular en el tejido, es posible que el GABA endógeno en las células cromafines adrenales tenga una participación moduladora en la exocitosis de catecolaminas. Esto permitiría una gran influencia reguladora de éste neurotransmisor en las funciones de las células cromafines.

La mayoría de los trabajos en donde se ha explorado el efecto de la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> en células cromafines, se han realizado en células disociadas y mantenidas en cultivo. Poco se ha explorado acerca de la modulación autócrina y parácrina del GABA en el tejido adrenal y su posible participación como regulador de la función de las células cromafines. En este sentido, es muy posible que el GABA endógeno pudiera tener efectos de mayor impacto fisiológico en la función de la medula adrenal de los que se predicen por estudios en células disociadas.

El presente trabajo tiene como objetivo caracterizar los posibles efectos moduladores del GABA exógeno y endógeno sobre la concentración intracelular basal de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, y sobre los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> que se presentan espontáneamente en las células cromafines, utilizando técnicas ópticas y rebanadas de tejido adrenal donde es posible preservar las condiciones del microambiente tisular. Ya que los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular determinan la secreción de catecolaminas en estas células, por lo cual el GABA endógeno podría ser un factor crucial en la función endócrina de las células cromafines de la médula adrenal de rata.

### **3 Hipótesis**

Las concentraciones basales de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , los transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  y las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por estímulos colinérgicos nicotínicos en células cromafines, que determinan la secreción de catecolaminas, son moduladas por los receptores  $\text{GABA}_A$  activados parácrinamente por el ácido gamma-aminobutírico endógeno.

### **4 Objetivo general**

Examinar el efecto de GABA exógeno y endógeno sobre la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$  espontáneos y las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por activación de receptores nicotínicos en las células cromafines en rebanadas de tejido de la glándula adrenal de rata.

#### **4.1 Objetivos Particulares**

- Evaluar si la activación de los receptores  $\text{GABA}_A$  por agonistas exógenos modifica la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , así como los transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  en células cromafines en la rebanada de glándula adrenal de rata.
- Caracterizar el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores  $\text{GABA}_A$  y por ende, de las acciones del GABA endógeno sobre la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , los transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  y las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  producidas por la activación de receptores nicotínicos en células cromafines en la rebanada de glándula adrenal de rata.
- Determinar si el(los) efecto(s) en la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , así como los transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  y las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por la activación de receptores nicotínicos se deben a que el GABA endógeno modula autócrina/parácrinamente a las células cromafines (acción post-sináptica) y/o si es consecuencia de modular la liberación de acetilcolina de las terminales colinérgicas del nervio esplácnico (acción pre-sináptica).

## 5 Métodos

Los animales utilizados en este trabajo fueron obtenidos de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde fueron mantenidos bajo el protocolo para uso y cuidado de animales de laboratorio de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Las ratas utilizadas para el proceso experimental se mantuvieron con alimentación y agua *ad libitum*, a temperatura constante y bajo un ciclo de 12 horas luz / 12 horas oscuridad.

### 5.1 Obtención de rebanadas de glándula adrenal para registros *in vitro*

Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 semanas de edad. Los animales se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (0.1 ml/250 g) y se sacrificaron por decapitación, inmediatamente ambas glándulas adrenales fueron removidas y embebidas en solución salina normal que contenía en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub> y 10 glucosa, saturada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, para mantener el pH = 7.4 y a una temperatura de 8° C. En seguida el exceso de grasa de ambas glándulas fue retirado; posteriormente se preparó agar al 3 % diluido en solución salina normal y se llevó a 100° C, después se dejó enfriar y una vez que alcanzó una temperatura aproximada de 35° C las glándulas se embebieron dentro del agar, una vez con el tejido adrenal incorporado, el agar se solidificó en refrigeración. Una vez solidificado, los bloques de agar fueron recortados en cubos de aprox. 5 mm, estos se posicionaron y fijaron a un soporte móvil de un vibratomo (Vibratome 3000), para luego ser cubiertas con solución salina normal a punto de congelación.

Se obtuvieron rebanadas de 200 µm de grosor, las cuales fueron colectadas y mantenidas en solución salina normal a 25 °C, bajo estas condiciones las rebanadas se mantienen viables durante un lapso de hasta 6 horas después de la preparación. Con este procedimiento se obtuvieron las rebanadas que se utilizaron en todos los protocolos.

## 5.2 Imagenología de $\text{Ca}^{2+}_i$ en células cromafines de rebanada de glándula adrenal.

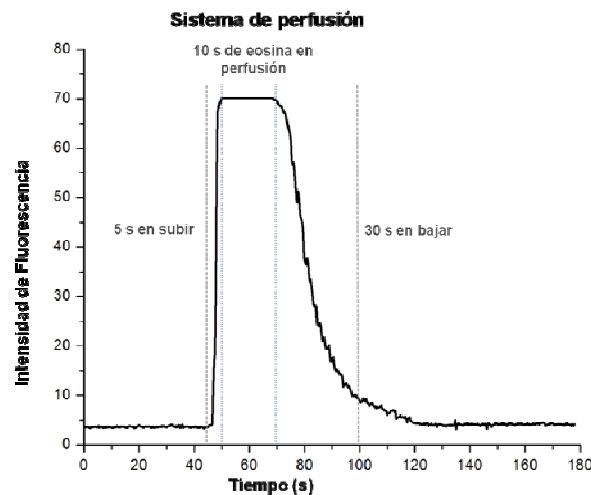
Para los registros de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , las rebanadas adrenales se incubaron en oscuridad durante 35 min. Inmersas en solución salina normal en presencia 10  $\mu\text{m}$  del indicador sensible a calcio fluo-4 AM (Teflabs;Austin, EUA) con 0.5% de ácido plurónico F-127 (Sigma,St Luis MO, EUA) en una atmósfera saturada con 95 %  $\text{O}_2$  y 5 %  $\text{CO}_2$ . Después de la incubación las rebanadas se lavaron con solución salina normal y se colocaron sobre un cubre objetos de vidrio recubierto con poli-L-lisina 0.3 % y posteriormente se montaron sobre el fondo de una cámara de registro sobre la platina de un microscopio vertical de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Melville, Ny) equipado con un objetivo 20x (apertura numérica 0.5) de inmersión en agua. Las rebanadas se mantuvieron bajo perfusión continua de solución salina normal saturada con 95 %  $\text{O}_2$  y 5 %  $\text{CO}_2$  (1ml/min) temperatura de 23°C, durante todo el registro.

La excitación del fluoróforo se realizó a 488 nm mediante un sistema que se compone de una lámpara de Xenón adaptada a un monocromador Polychrome V (Till Photonics) conectado por medio de una fibra óptica al microscopio. La fluorescencia emitida fue seleccionada al pasar por una serie de filtros de emisión (540 nm) Nikon B-2E/C. Las imágenes con un campo de registro de 800X600  $\mu\text{m}$ , fueron adquiridas con una cámara CCD (cooled digital camera) IMAGO-QE a 3 cuadros/segundo con una exposición de 15 ms por imagen, estos protocolos fueron escritos en el software TILLVISION 4.0 (TILL Photonics). De esta forma se adquirieron secuencias de imágenes cortas (películas) de 540 imágenes en 180 segundos, con intervalos de 2 a 3 min entre cada secuencia.

Después de todos protocolos farmacológicos, se agregó a la cámara de registro una solución con alto potasio que contiene en mM: 50 KCl, 120 NaCl, 10 HEPES-Na y 2 de  $\text{CaCl}_2$  a un pH 7.4, la cual induce la despolarización de las células y consecuentemente la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de calcio dependientes de voltaje, a partir de esto se determinó el número total de células viables, tanto silentes como activas y que incorporaron el fluoróforo.

### 5.3 Fármacos

Las soluciones utilizadas fueron preparadas antes de cada experimento y añadidas a través de un sistema de perfusión estandarizado y previamente calibrado de tal modo que los fármacos se mantuvieran en la cámara de registro (donde se colocó el tejido) en el tiempo requerido y en la concentración preparada. Para lograr esto, la perfusión se calibró previamente con eosina, un colorante ácido fluorescente, este colorante se adicionó a través del sistema de perfusión a la cámara de registro sin tejido. Posteriormente se ajustó la velocidad de entrada y salida de la solución en la perfusión a la cámara de registro, para que la entrada de la eosina fuera rápida, la concentración se mantuviera estable durante el tiempo requerido, según el protocolo, y finalmente se lavará completamente (Fig. 6). Los fármacos utilizados fueron: muscimol (agonista de receptores GABA<sub>A</sub>); bicuculina, bicuculina-metiodida (Bic-Met) y picrotoxina (antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub>), nicotina ditartrate y mecamilamina, antagonista y agonista de receptores nicotínicos respectivamente (Sigma, St. Louis, MO, USA).



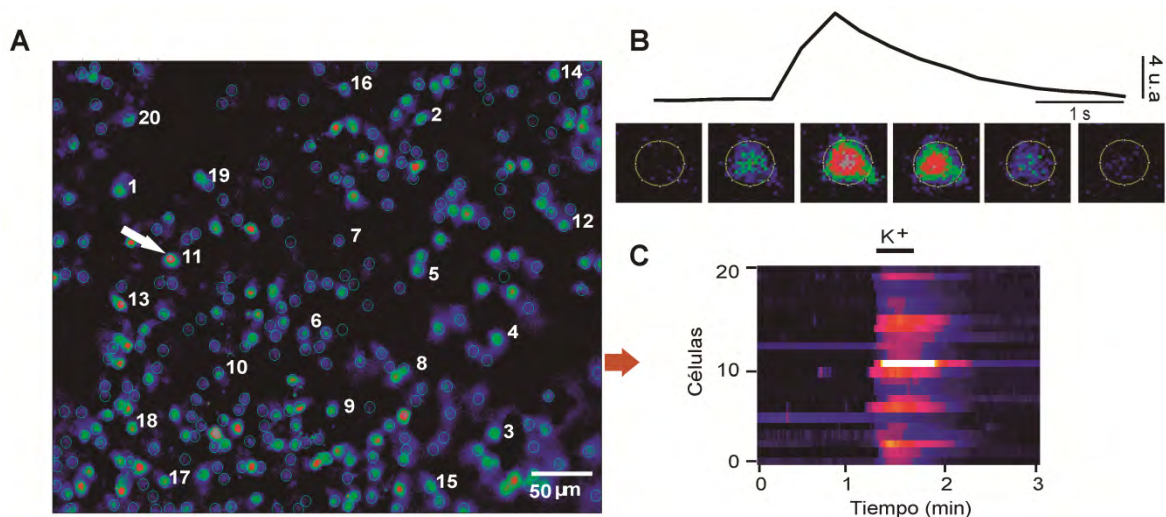
**Figura 6. Estandarización del sistema de perfusión con eosina.** Se adquirió una secuencia de imágenes de 180 s (eje x) midiendo la intensidad de fluorescencia de la eosina adicionada a la cámara de registro través del sistema de perfusión (eje y). La velocidad de entrada de la eosina a la cámara de registro a través de la perfusión es de 5 s, posteriormente se mantuvo hasta que alcanzó su concentración máxima y se mantuvo estable, la salida de la eosina de la cámara de registro requirió de 30 s y finalmente se lavó completamente.



#### 5.4 Análisis de Imágenes

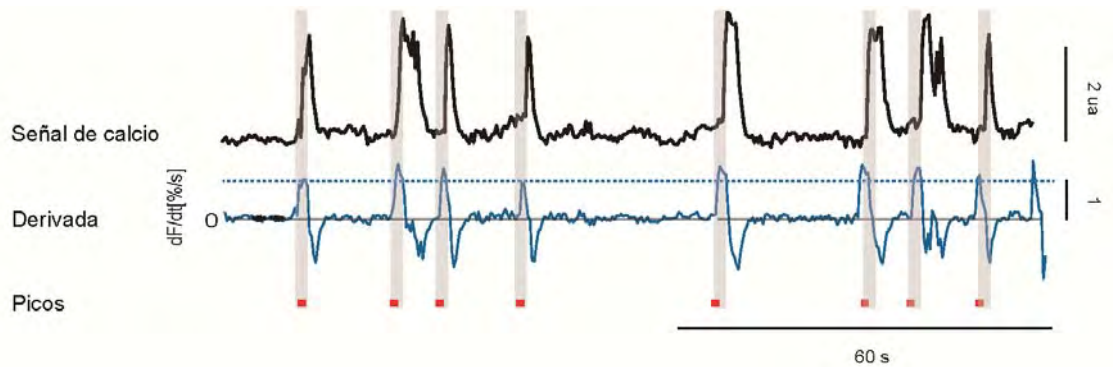
El procesamiento de las secuencias de imágenes se llevó a cabo con los programas Image J (v.1.36, National Institutes of Health), con el cual se eliminó el ruido generado por píxeles únicos, utilizando como filtro, el promedio mínimo de los 540 píxeles de la secuencia de imágenes. Las señales de fluorescencia dependientes de calcio fueron computadas como  $(F_i/F_o)/F_o$  donde  $F_i$  es la intensidad de fluorescencia en cualquier cuadro de la película y  $F_o$  es la fluorescencia basal (el promedio mínimo de fluorescencia de todos los cuadros de la película). El análisis de las células individuales se realizó sobre la secuencia de imágenes filtrada. Los valores de la intensidad de fluorescencia de las células individuales se obtuvieron por medio de la selección de las áreas de interés (ROI's, por sus siglas en ingles), correspondientes a las células que presentaron un incremento en la intensidad de fluorescencia, durante la secuencia final de imágenes a la que se le adicionó alto potasio. Esta selección de áreas se usó para localizar los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas de interés en todas las secuencias de imágenes (control, tratamientos, lavado y potasio), de este modo se confirmó que todas las áreas coincidieran y que el campo de registro en la rebanada no se modificara.

Los datos de la intensidad de fluorescencia de cada área obtenida se colocaron en una gráfica donde se hace el seguimiento en el tiempo en minutos (eje x) de los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas obtenidas (células, eje y), en cada una de las secuencia de imágenes. En este tipo de gráficas, al que denominaremos gráfico tipo "raster", se puede observar la respuesta conjunta de las células cromafines en una escala de pseudo-color, donde los colores más cálidos (rojo, amarillo) representan en unidades arbitrarias los valores más altos de la intensidad de fluorescencia, lo cual indica un incremento en el  $Ca^{2+}_i$  y los colores más fríos (azul, negro) representan los valores más bajos de la intensidad de fluorescencia, lo que indica decrementos en los niveles de  $Ca^{2+}_i$ . El gráfico tipo raster, se obtuvo en el programa Igor Pro 5.03 (Wavametrics Inc., OR, EUS, con protocolos escritos por el Dr. León Islas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM), en donde se puede dar el seguimiento de la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo de cada área seleccionada en cada una de las secuencias (Fig. 7).



**FIGURA 7. Análisis de Imágenes.** **A.** Imagen en seudocolor de la selección de ROI's (células) durante la despolarización generada con potasio en el campo de registro (la médula adrenal) cada ROI representa una célula, de la cual se puede seguir su intensidad de fluorescencia lo largo del tiempo de manera individual (**B**), así como el comportamiento del  $\text{Ca}^{2+}_i$  de todas las células seleccionadas (20 en este ejemplo) mediante un gráfico tipo raster (**C**).

Todas las células viables a lo largo del registro fueron analizadas para posteriormente obtener la tasa de células activas e inactivas. Cuando las células tienen actividad espontánea, generan transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  (incrementos espontáneos en sus concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}_i$ ), los cuales promueven la exocitosis de catecolaminas. Durante un transitorio de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , la velocidad de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  a las células aumenta. Si se grafica el transitorio con una línea en función del tiempo, se podrían obtener los cambios en las señales de  $\text{Ca}^{2+}_i$  se puede calcular al obtener los valores de las derivadas, ya que el valor de la derivada en función del tiempo es mayor donde el cambio de la señal de  $\text{Ca}^{2+}_i$  es más rápido (el valor de la derivada con la máxima razón de cambio). Para diferenciar a las células que mostraron actividad espontánea de las que no la mostraron y para el análisis de las frecuencia de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$  de cada célula, se calculó la desviación estándar de los valores de las derivadas con respecto a la línea basal o media, solo se tomaron en cuenta los valores de las derivadas con la máxima razón de cambio, que superaron un valor de desviación estándar de uno con respecto a la media (Fig. 8). Las derivadas negativas se producen cuando comienza la fase de descenso del transitorio de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , sin embargo solo se tomaron en cuenta las derivadas máximas positivas para los análisis.



**Figura 8. Análisis de frecuencia de picos.** Los transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  fueron analizados al obtener el valor de la máxima derivada de las señales de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , este valor manifiesta el momento donde se presentó un mayor incremento del  $\text{Ca}^{2+}_i$  en función del tiempo. Para cada transitorio de  $\text{Ca}^{2+}_i$  se tomó el valor de la máxima derivada que supera una desviación estándar de uno con respecto a la línea basal o promedio de los valores de derivada.

## 5.5 Registro electrofisiológico de potenciales de acción

Para evaluar si la aplicación de GABA exógeno o la acumulación de GABA endógeno afectaba el potencial de reposo y la generación de potenciales de acción de las células, se realizaron los registros electrofisiológicos usando la técnica de fijación de membrana (*patch clamp*) en la configuración parche perforado en célula completa (Rae et al., 1991) este tipo de manipulación evita la diálisis del medio intracelular.

Los registros de potenciales de acción se realizaron en modo fijación de corriente en una cámara de registro mantenida a 22 °C. Para la adquisición de los datos se utilizó un amplificador EPC-10 con el programa PatchMaster (HEKA instruments). Los datos se adquirieron a una frecuencia de 10 kHz y fueron filtrados a 2 kHz y se almacenaron en una computadora Macintosh G4.

Las pipetas de registro utilizadas se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato con 1.2 mm de diámetro externo y 0.69 mm de diámetro interno (World Precisión Instruments, florida, EUA) y fueron fabricados mediante un estirador de capilares a base de calor modelo P-97 (Sutter Instruments Co., EUA). La composición intracelular de la solución, con la que se llenaron los microelectrodos de registro fue en mM: 140 K-glu, 8 NaCl, 20 Hepes, 2  $\text{MgCl}_2$ , 5 EGTA, pH 7.3. En la modalidad de parche perforado se agregó a la solución interna 50-100 mg/ml de anfotericina-B como agente perforante.

Las rebanadas adrenales se colocaron en una cámara de registro ubicada en la platina de un microscopio vertical (Eclipse FNI, Nikon, Tokyo, Japón). La imagen de las rebanadas fue enviada hacia un monitor mediante una cámara CCD conectada al microscopio, los registros se realizaron observando la muestra con un objetivo 40x. La rebanada en registro se mantuvo con perfusión constante de 1.5 ml/min de solución salina normal. El volumen al cual se mantuvo la cámara de registro fue de 0.5 ml/ min.

Una vez identificada la célula a registrar el microelectrodo se acercó lentamente hacia la célula por medio de un micromanipulador Sutter MPC-200 (Sutter Instruments), durante esta manipulación se aplicó presión positiva en el microelectrodo para evitar que se ensucie de la punta antes de llegar a la célula (resistencia 4 – 5 M $\Omega$ ); a medida que se acercó el microelectrodo a la célula y en el momento en el cual se tocó la membrana celular, se observó un ligero incremento en la resistencia del sello, en ese momento se quitó la presión positiva y se aplicó una ligera presión negativa (succión) para promover la generación de un sello de alta resistencia en el orden de al menos 1 Gigaohm (G $\Omega$ ) entre el microelectrodo y la membrana celular (Hamill y cols, 1981). Una vez que se obtiene el sello de alta resistencia, se deja que la anfotericina-B forme poros en la membrana celular hasta obtener los transitorios capacitivos y que la resistencia en serie sea menor a 20 M $\Omega$ , esto ocurre entre 5 y 10 minutos después de haber logrado el sello, en ese momento se fija la corriente de la célula.

## **5.6 Análisis de Datos**

El número de transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en función del tiempo, fueron obtenidas por medio del programa fSIENN (Image) escrito por el Ing. Jesús Pérez adscrito al laboratorio del Dr. José Bargas Díaz del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El área bajo la curva de los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en función del tiempo fueron obtenidas por la rutina escrita en MATLAB (the Math-Works, Inc., Natick, MA, EUA) por el Ing. Manuel Álvarez, Técnico Académico, Instituto de Fisiología Celular; UNAM. Los datos fueron analizados con una prueba de normalidad (D'Agostino y Pearson). Para la comparación estadística, se usó la prueba pareada de t de Student o la prueba no pareada de Wilcoxon, donde fuera apropiado. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPadPrism (GraphPad Software, Inc., CA, EUA).

## 6 Resultados

La dinámica celular se puede observar por el registro de los cambios en la actividad de un gran número de células con resolución de célula única, la cual permitió describir correctamente la posible participación de cada una de ellas en las respuestas fisiológicas de la médula adrenal, esto es importante por la gran diversidad de respuestas celulares que se pueden encontrar en este tejido.

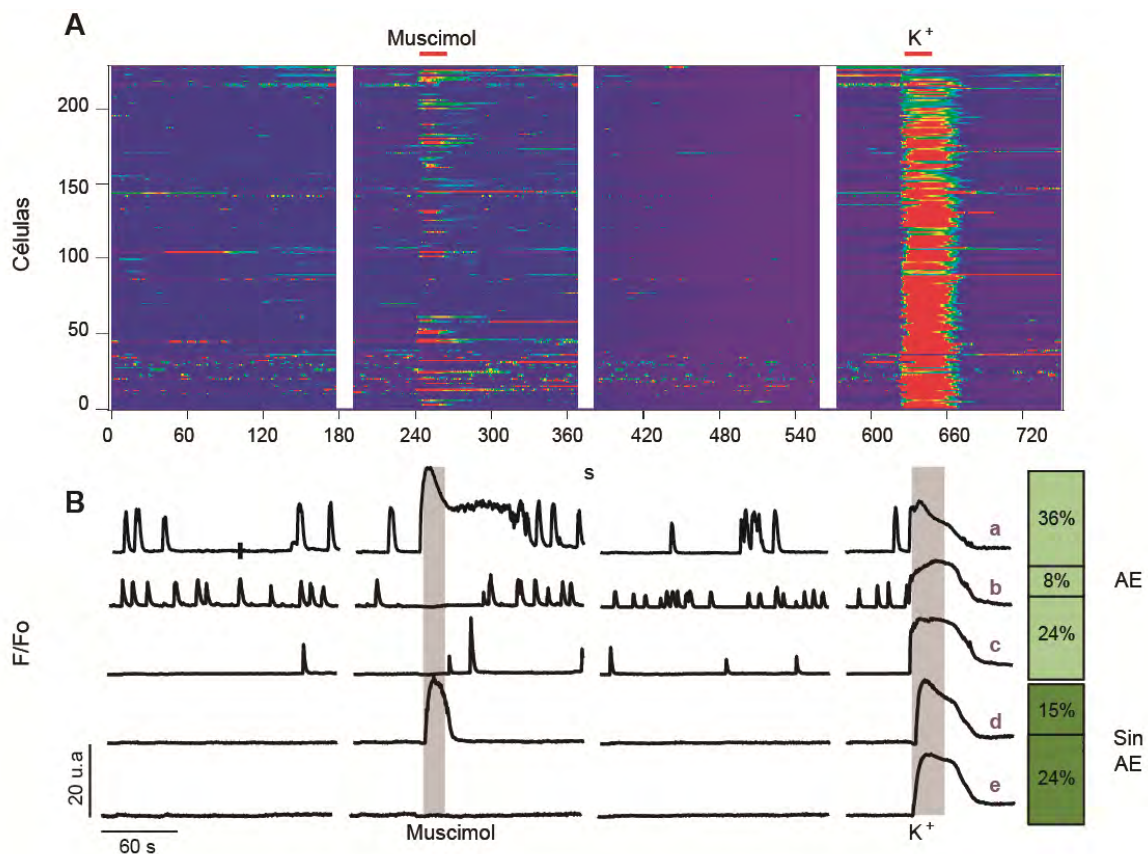
### 6.1 Cambios en el $Ca^{2+}_i$ producidas por la estimulación de receptores $GABA_A$ en las células cromafines.

Está reportado que aproximadamente 65% de las células cromafines presentan transitorios espontáneos de  $Ca^{2+}_i$  (actividad espontánea) esto contribuye a mantener la liberación basal de catecolaminas, por lo tanto esta actividad espontánea de las células cromafines es un importante parámetro de la adecuada función de la glándula adrenal (Malgaroli, 1990, Micheletti, 2005). Para poder observar la actividad espontánea de las células cromafines, se adquirió en todos los casos una secuencia de imágenes de tres minutos en condiciones basales antes de cualquier tratamiento.

Para identificar, cuantificar y caracterizar la respuesta de las células cromafines a la estimulación de los receptores  $GABA_A$ , se aplicó muscimol (20  $\mu$ M) un agonista específico de estos receptores, en la segunda secuencia de imágenes a través del sistema de perfusión, durante 25 segundos. Esto fue seguido de una secuencia de imágenes durante el lavado de muscimol. Al final de cada experimento, se adicionó alto potasio (50 mM) el cual induce la despolarización de las células y consecuentemente la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales de calcio sensibles a voltaje. A partir de estas imágenes se determinó el número total de células viables (100%), tanto silentes como activas y que incorporaron el fluoróforo, y con respecto a ellas se realizó la normalización para obtener los porcentajes de las diversas respuestas celulares como se ilustra en la Figura 7.

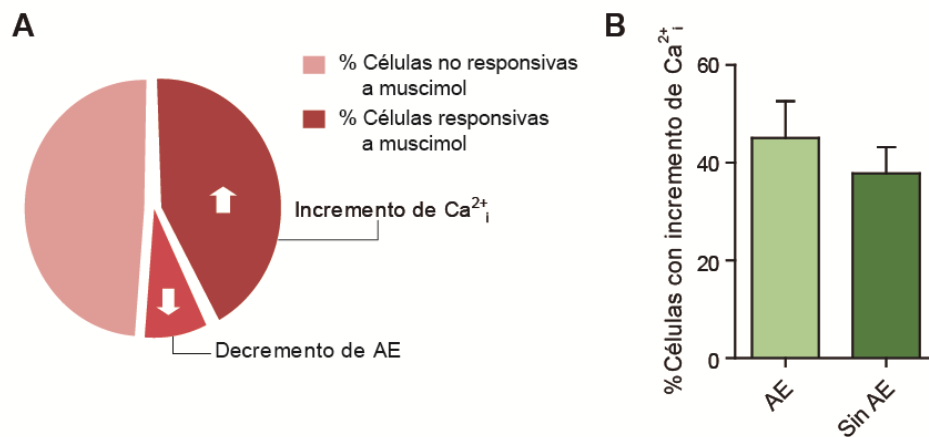
Al realizar el seguimiento de los cambios en la fluorescencia, célula por célula, en el gráfico tipo raster, encontramos que  $61 \pm 10\%$  ( $n=5$  rebanadas) de las células tienen actividad espontánea de  $Ca^{2+}_i$ . Para esto se tomó en cuenta que el registro de la célula mostrara cuando menos un transitorio de  $Ca^{2+}_i$ . Un transitorio de  $Ca^{2+}_i$  correspondiente a la actividad espontánea de la célula, se contabilizó cuando el transitorio sobrepasara el umbral, es decir el valor de la derivada con la máxima

razón de cambio y de más de una vez la desviación estándar por arriba de la línea basal o promedio de los valores de las derivadas (Fig. 9Ba, b y c). Las células que no cumplieran con este criterio fueron caracterizadas como células sin actividad espontánea (Fig. 9Bd y e). Como ya se señaló, la viabilidad de todas las células se evaluó al final del registro.



**FIGURA 9. Efecto de muscimol, un agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, sobre el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en células cromafines. A.** Gráfica tipo raster, donde se hace el seguimiento en el tiempo en segundos (eje x) de los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas obtenidas (células, eje y), en cada secuencia de imágenes, donde se puede observar la respuesta conjunta de las células cromafines a muscimol. **B.** En los trazos inferiores se muestra el seguimiento de la intensidad de fluorescencia de 5 células individuales en cada una de las secuencias de imágenes, los patrones más comunes son: (a), las que mostraron un incremento de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en respuesta a la adición de 20 μM de muscimol y que previamente mostraban actividad espontánea (b), aquellas en las que se suprime la actividad espontánea en presencia de muscimol (c), células espontáneamente activas en las que no hubo respuesta aparente (d) células sin actividad y que respondieron a muscimol y (e) células sin actividad y que no respondieron a muscimol.

Una primera observación fue que la aplicación de muscimol induce un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$  en una fracción de las células cromafines. El porcentaje de células que respondió a 20  $\mu\text{M}$  de muscimol con un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$ , fue de  $42 \pm 6\%$ . Además observó un porcentaje de células que mostraron inhibición de la actividad espontánea en presencia de muscimol ( $8 \pm 1\%$ ). El  $49 \pm 5\%$  de las células restantes, no mostraron ninguna respuesta a la aplicación de muscimol (Fig. 10 A). Éste resultado indica que más del 50% de las células cromafines tienen una respuesta funcional a la estimulación del receptor  $\text{GABA}_A$  con su agonista específico, exógeno, el muscimol, aplicado extracelularmente.



**FIGURA 10. Efecto de la activación de receptores  $\text{GABA}_A$  en el  $\text{Ca}^{2+}_i$  por muscimol en las células cromafines.** **A.** Gráfica circular que muestra el porcentaje de células que responden a muscimol (50%), diferenciando las células que responden con un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$  ( $42 \pm 6\%$ ), las que muestran un decremento en la actividad espontánea en presencia de muscimol ( $8 \pm 1\%$ ) y las células en donde muscimol no tiene efecto ( $49 \pm 5\%$ ). **B.** Comparación de los porcentajes de células que responden a muscimol con un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$  del total de células con ( $45 \pm 7\%$ ) y sin actividad espontánea ( $38 \pm 5\%$ ), no muestran diferencias significativas ( $n=5$ ,  $P = 0.3$ ).

La activación del receptor  $\text{GABA}_A$  incrementa el  $\text{Ca}^{2+}_i$  en el 42% de las células cromafines y la actividad espontánea está presente en el 60% de estas células, por lo tanto, exploramos la posibilidad de una correlación entre las células que presentaron actividad espontánea en la secuencia de imágenes control con las células que respondieron a muscimol con un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$ . Para obtener la correlación, se tomó como 100% al total de células que mostraron transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  y de éstas se determinó cuantas incrementaron el  $\text{Ca}^{2+}_i$  en

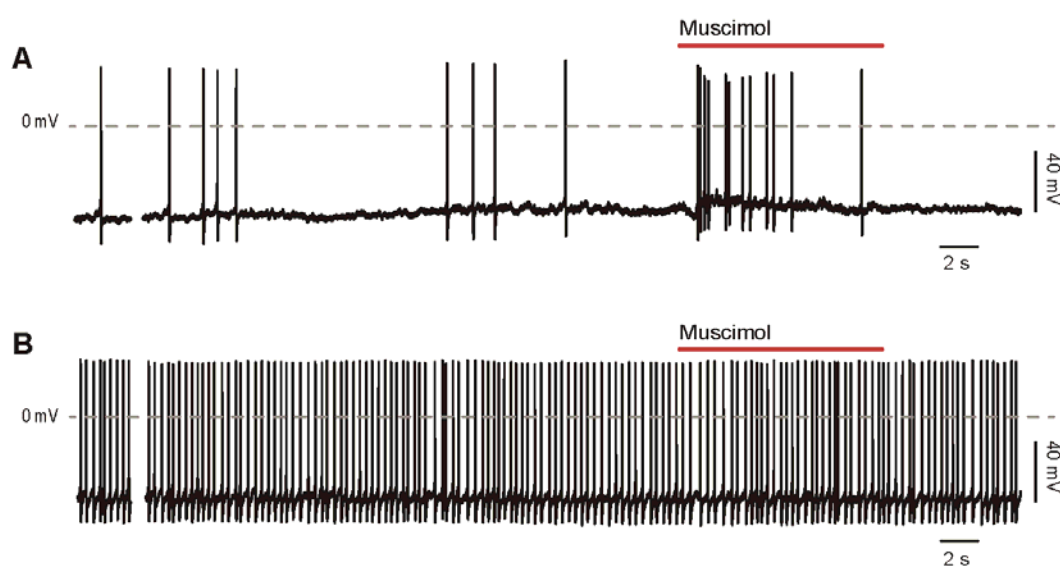
respuesta a la estimulación de los receptores GABA<sub>A</sub> con muscimol, las cuales fueron el 45 ± 7% del total de células que presentaron actividad espontánea de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>. De la misma manera se tomó como el 100% a las células sin actividad espontánea de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, y se encontró que respondieron al muscimol 38 ± 5% del total de células sin fluctuaciones espontáneas de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (Fig. 10 B). Los porcentajes de las células que respondieron a muscimol en ambos grupos (con y sin transitorios espontáneos de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>) no tienen diferencias significativas (n=5, P = 0.3). Estos datos sugieren que la respuesta a muscimol de las células cromafines es independiente de si presentan o no actividad espontánea de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>.

## **6.2 La activación de los receptores GABA<sub>A</sub> despolariza el potencial de membrana de las células cromafines.**

Para explorar si el incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en las células cromafines es regulado por la despolarización que induce la activación de receptores GABA<sub>A</sub> con muscimol. Se realizaron registros electrofisiológicos en células cromafines individuales por medio de la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula entera con parche perforado. La maniobra del parche perforado evita dializar del medio intracelular. En este caso esto es crucial, dada la importancia de mantener las concentraciones de Cl<sub>i</sub> intactas y no alterar así el efecto fisiológico de la activación de receptores a GABA<sub>A</sub>.

Los registros de potenciales de acción en células cromafines en fijación de corriente, mostraron que la aplicación por 10 segundos de muscimol 20 μM, induce una despolarización de aproximadamente 5 mV e induce el incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción en 3 de 10 células (Fig. 11). Esto indica que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> por su agonista específico muscimol, induce la despolarización en la membrana en el 30% de las células cromafines, esto podría estar activando canales de calcio sensibles a voltaje y generar así el aumento transitorio en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> que se observa con la técnica de epifluorescencia.





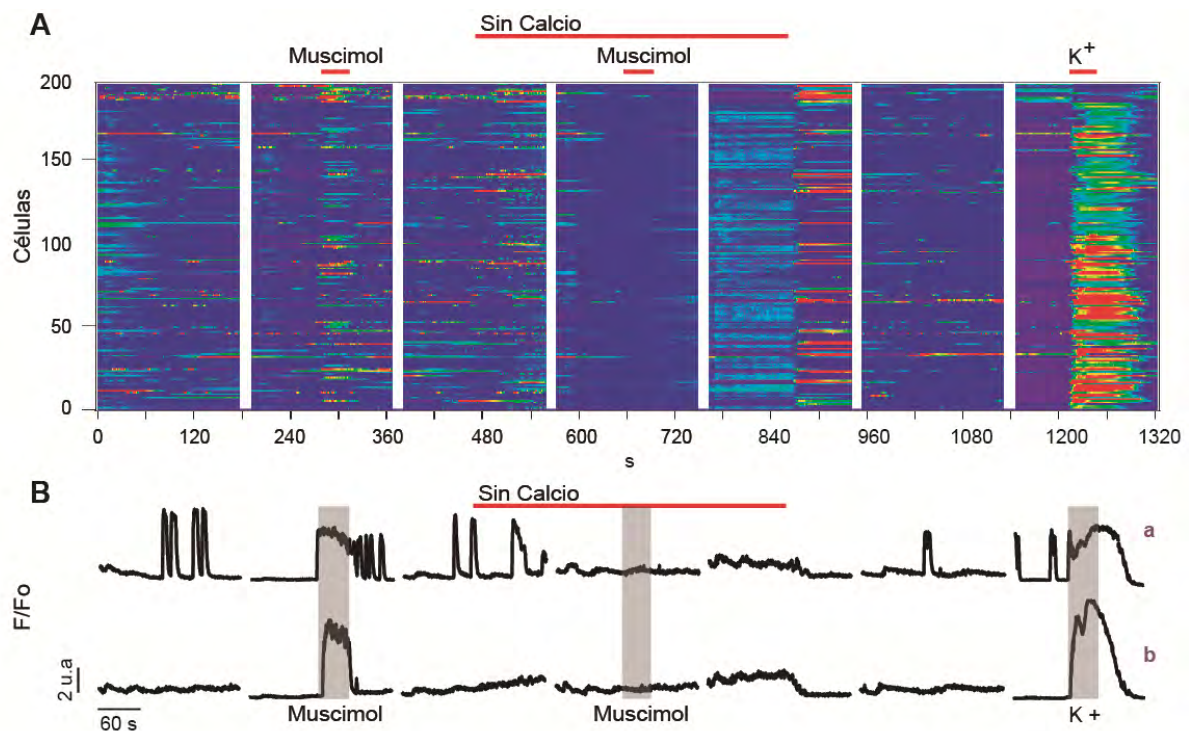
**FIGURA 11. Efecto de Muscimol en el potencial de membrana en células cromafines. A.** Trazos representativos de la fijación de corriente en una célula cromafin, que muestran potenciales de acción espontáneos. La aplicación de muscimol induce una despolarización de aproximadamente 5 mV, esto produce un incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción (3 de 10 células). **B.** Trazo representativo de una célula cromafin que presentó potenciales de acción espontáneos, en la cual, la aplicación de muscimol no tuvo efecto en el potencial de membrana y por lo tanto no afectó su frecuencia de disparo (7 of 10 células).

### 6.3 El incremento del $Ca^{2+}_i$ por estimulación del receptor $GABA_A$ depende de la presencia de $Ca^{2+}$ extracelular.

La activación de los receptores  $GABA_A$  produce un flujo selectivo de iones cloruro ( $Cl^-$ ) a través de su canal iónico. En las células donde la concentración de  $Cl^-$  intracelular es mayor con respecto a la concentración extracelular, el efecto de la activación del receptor  $GABA_A$  es una despolarización, debido a la movilización de  $Cl^-$  hacia el medio extracelular dirigida por el  $E_{Cl}$  y el  $V_m$ . La activación del receptor  $GABA_A$  podría inducir cambios en el voltaje de la membrana de las células cromafines, por lo tanto, podrían estar produciendo la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje. Esto podría inducir el incremento en el  $Ca^{2+}_i$  en el 42% de las células cromafines (Fig. 10). Un mecanismo opuesto (hiperpolarización) podría estar ocurriendo en aquellas células cromafines que disminuyeron el nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular durante la estimulación de receptores  $GABA_A$ .

Para corroborar que el incremento de  $Ca^{2+}_i$  por la estimulación del receptor  $GABA_A$  depende de la presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, se aplicó el agonista de

GABA<sub>A</sub> en presencia de una solución salina libre de Ca<sup>2+</sup>. Para esto, se sustituyó equimolarmente el Ca<sup>2+</sup> (2 mM) por Mg<sup>2+</sup> (2 mM) en la solución salina para mantener las condiciones iónicas y osmolaridad de la solución, además se agregó 0.5 mM de EGTA (ácido tetra-acético glicol etileno) como agente quelante del Ca<sup>2+</sup> para asegurar que no hubiera Ca<sup>2+</sup> remanente en la rebanada. Con esto se observó si el incremento del Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducido por la activación de receptores GABA<sub>A</sub> depende o no del Ca<sup>2+</sup> extracelular que fluye a través de canales de calcio sensibles a voltaje que pudieron activarse por la despolarización.



**FIGURA 12. El incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducido por activación de receptores GABA<sub>A</sub> es dependiente de Ca<sup>2+</sup> extracelular. A.** Gráfica tipo raster, donde se hace el seguimiento en el tiempo en segundos (eje x) de los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas obtenidas (células, eje y) en cada secuencia de imágenes. Se muestra que el incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, por la estimulación de receptores GABA<sub>A</sub> con muscimol, se previene durante la perfusión de una solución libre de Ca<sup>2+</sup> extracelular. **B.** En los trazos inferiores, se muestra el seguimiento de la intensidad de fluorescencia de dos células cromafines individuales que mostraron un incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en respuesta a la estimulación del receptor GABA<sub>A</sub> con muscimol, este incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> no se observó en las mismas células durante la aplicación de una solución salina normal libre de Ca<sup>2+</sup>, bajo estas mismas condiciones los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> espontáneos se eliminaron en todas las células cromafines (n= 5 rebanadas).

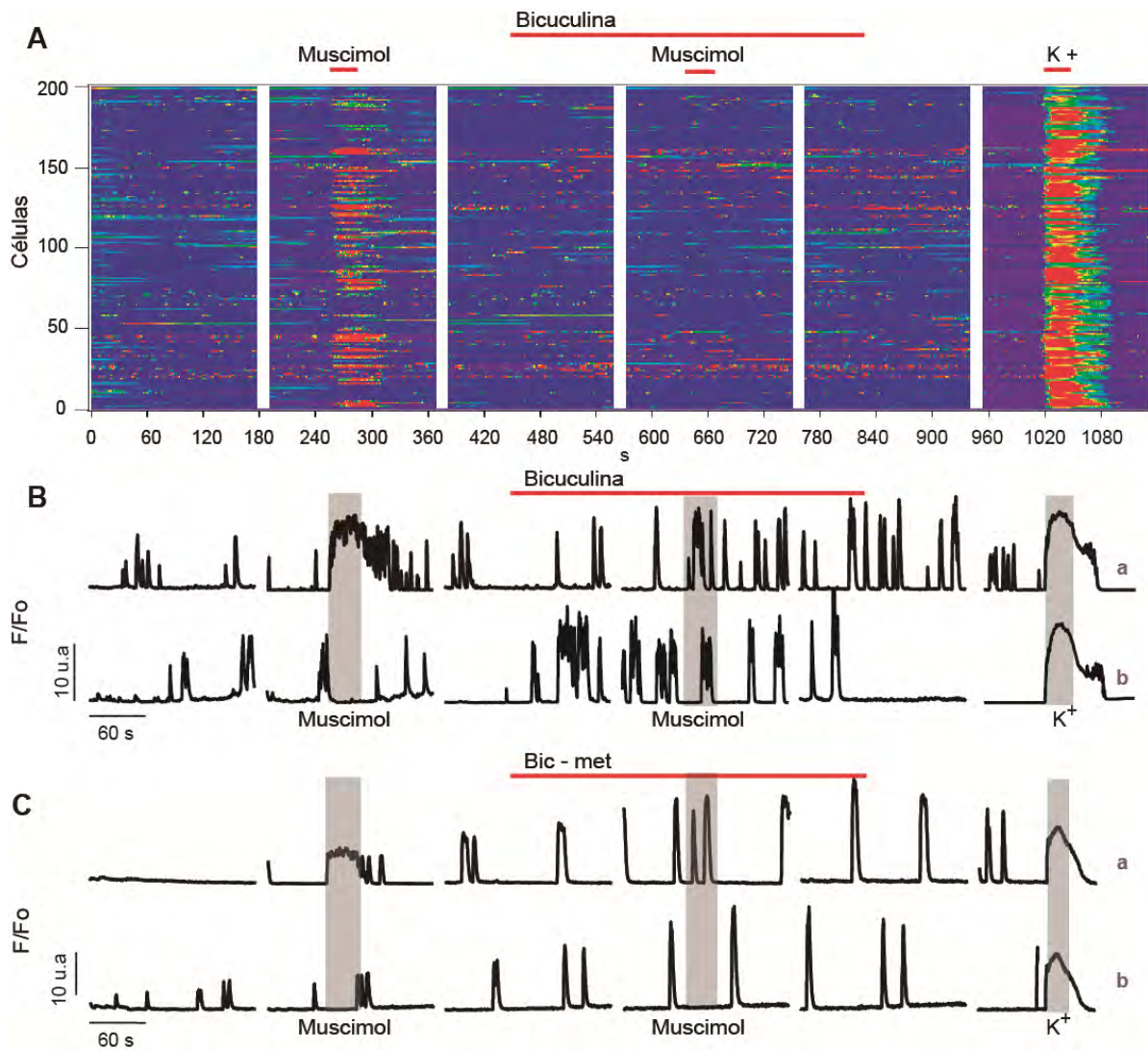
Los resultados muestran que los transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , así como el incremento de  $\text{Ca}^{2+}_i$  inducido por la activación del receptor  $\text{GABA}_A$  con muscimol dejaron de observarse durante la perfusión de la rebanada con la solución libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 12). Esto muestra que el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$  inducido por la aplicación de muscimol es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, por lo tanto la ruta que lleva a un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$  por efecto de la estimulación de los receptores  $\text{GABA}_A$  es a través de canales de calcio sensibles a voltaje.

#### **6.4 Efectos de GABA endógeno en los transitorios de $\text{Ca}^{2+}_i$ en las células cromafines.**

Para examinar si el efecto de muscimol es específico de receptores  $\text{GABA}_A$ , se aplicó Bic-Met o bicuculina 50  $\mu\text{M}$ , antagonistas específicos de estos receptores, a través del sistema de perfusión a partir del segundo 35 de la tercer secuencia y hasta el segundo 35 de la quinta secuencia de imágenes (6 min. aproximadamente), con esto se observó que el incremento del  $\text{Ca}^{2+}_i$  por estimulación de receptores  $\text{GABA}_A$  con muscimol, es bloqueado en el 100 % de las células en presencia de cualquiera de sus antagonistas específicos Bic-Met y bicuculina (Fig. 13).

Al caracterizar el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores  $\text{GABA}_A$  activados por muscimol, se bloqueó la activación los receptores  $\text{GABA}_A$  por el GABA endógeno presente en microambiente del tejido adrenal, de este modo se observó el efecto del GABA endógeno en la actividad del  $\text{Ca}^{2+}_i$  de las células cromafines.

Los resultados obtenidos durante la aplicación de Bic-Met en la actividad espontánea de las células cromafines sugieren que el GABA endógeno activa receptores  $\text{GABA}_A$  tónicamente, ya que las espigas espontáneas de  $\text{Ca}^{2+}_i$  se modificaron en amplitud y frecuencia en presencia del antagonista de receptores  $\text{GABA}_A$ . Sin embargo se ha reportado que Bic-Met, a pesar de ser ampliamente utilizado para bloquear receptores  $\text{GABA}_A$  por su facilidad de dilución y por no tener el inconveniente de ser sensible a la luz como la Bicuculina, incluye entre sus acciones el bloqueo de canales de potasio activados por calcio, SK (Khawaled *et al.*, 1999).



**FIGURA 13. El GABA endógeno regula la generación de fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}_i$  a través de la activación de receptores  $\text{GABA}_A$ .** **A.** Gráfica tipo raster, donde se hace el seguimiento en el tiempo en segundos (eje x) de los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas obtenidas (células, eje y) en cada secuencia de imágenes. Donde se muestra que el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$ , por la estimulación de receptores  $\text{GABA}_A$  con muscimol, se previene en su totalidad por la aplicación de los antagonistas selectivos de estos receptores (Bic-Met, Bic y picrotoxina). También se observan efectos que induce el bloqueo del GABA endógeno. **B.** Trazos representativos de una célula que muestra un incremento de  $\text{Ca}^{2+}_i$  en respuesta a la estimulación de  $\text{GABA}_A$  con muscimol (**a**), el cual fue bloqueado por el tratamiento con bicuculina, en la parte inferior se muestra el trazo representativo de otra célula donde la estimulación de  $\text{GABA}_A$  no tiene efecto o este puede ser un efecto inhibitorio (**b**), en ambos casos se puede observar el incremento en la amplitud y frecuencia de las fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}_i$  (Trazos **a** ( $38 \pm 2\%$ ) y **b** ( $16 \pm 3\%$ )). **C.** Efectos similares se muestran en los experimentos de dos células tratadas con Bic-Met.

Para descartar que los efectos de Bic-Met, en la actividad espontánea de las células cromafines, fueran inducidos por el bloqueo de los canales SK, se utilizaron otros antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>, como bicuculina 50 μM (fig. 13 A y B). La aplicación de bicuculina mostró los mismo efectos que se habían observado durante la aplicación de Bic-Met en las señales de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (Fig. 13 C). La aplicación de bicuculina y Bic-Met promovieron incrementos en la amplitud y frecuencia de los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> tanto en las células donde la estimulación previa de GABA<sub>A</sub> por muscimol produjo un incremento Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (38 ± 2%), como también en células donde muscimol no tuvo ningún efecto aparente en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (16 ± 3%). De esto resulta que un total de 54 ± 5% de células cromafines de 5 rebanadas mostraron efectos por el bloqueo de los receptores GABA<sub>A</sub> activados por el GABA endógeno, en tanto que el 46% de las células restantes no mostraron ningún efecto en su actividad de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>.

Parámetros como la frecuencia y amplitud de los transitorios espontáneos de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en las células cromafines indican en gran medida la participación de dichas señales en la secreción de catecolaminas. Para poder estudiar la magnitud de los cambios inducidos por bicuculina en la frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, se analizaron estos parámetros en las células que mostraron fluctuaciones de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> espontáneas en condiciones control y los transitorios inducidos por el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> (posiblemente activados tónicamente por el GABA endógeno) con bicuculina.

Para cuantificar los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> por minuto de cada una de las células, se realizó nuevamente la selección de los ROI's, en donde se tomó en cuenta únicamente las células con fluctuaciones de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en condiciones control y durante el tratamiento con bicuculina, verificando que todas las células seleccionadas se mantuvieran viables de principio a fin del registro con la prueba de alto potasio. Los transitorios fueron filtrados del ruido; y se obtuvieron los valores de las derivadas con la máxima razón de cambio, solo en los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> que sobrepasaron el umbral (una vez la desviación estándar por arriba del valor del ruido) fueron tomados en cuenta para el análisis.

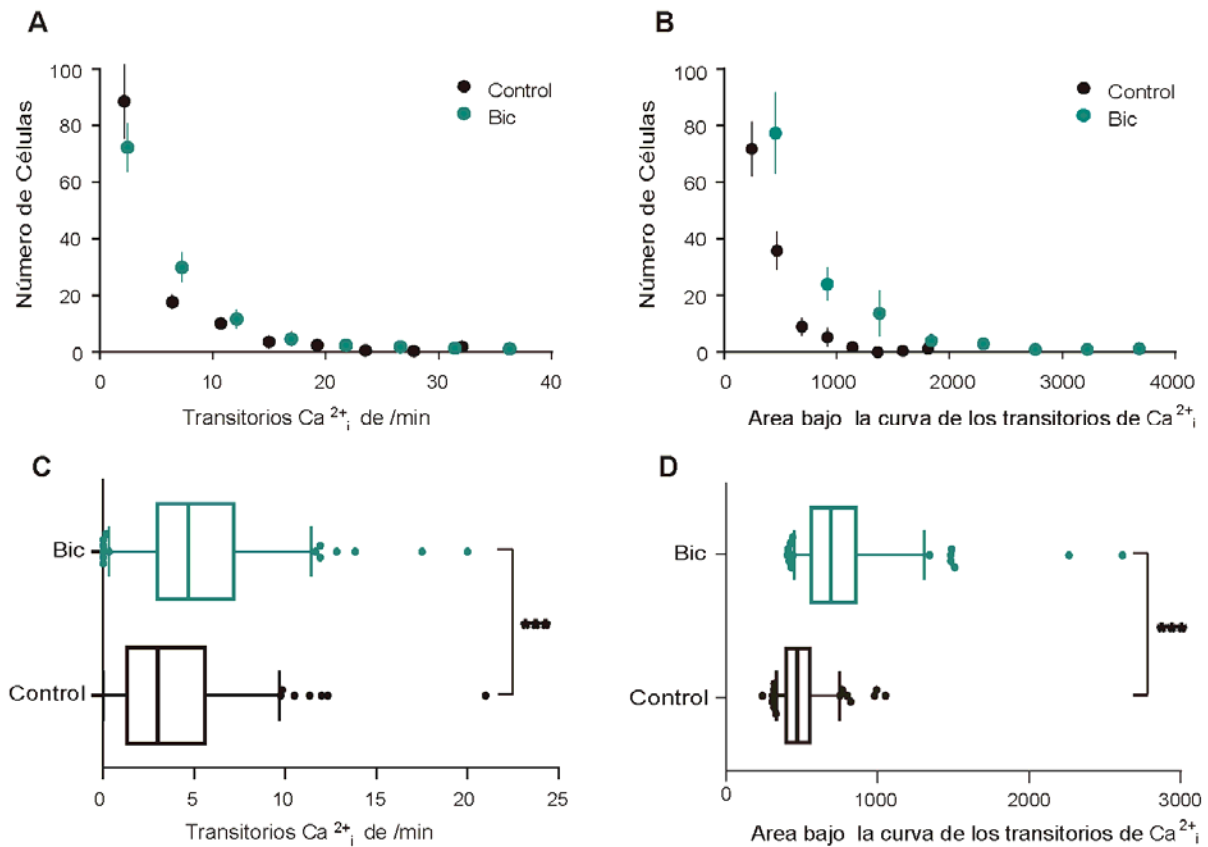
Por otra parte, bajo los mismo parámetros de la selección anterior, se obtuvo el área bajo la curva de todas las fluctuaciones de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> a lo largo de los tres minutos de la duración de la secuencia, tanto en condiciones control, así como los cambios inducidos bajo el tratamiento de bicuculina de cada una de las células.

Para el análisis de estos datos, se obtuvo la distribución de la frecuencia absoluta de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , las clases son intervalos de 4.3 (control) y 4.8 (bicuculina) transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$  por minuto (eje x) con respecto al promedio de las células  $\pm$  su error estándar (eje y) que presentaron dicha frecuencia (Fig. 14 A). Del mismo modo se obtuvo la distribución de la frecuencia absoluta del área bajo la curva de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , las clases son intervalos de 223 u.a (control) y 461 u.a (bicuculina) del área bajo la curva (eje x) con respecto al promedio de las células  $\pm$  su error estándar (eje y) que presentaron dicha área bajo la curva (Fig. 14 B).

La prueba de normalidad (D' Agustino y Pearson) en la distribución de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , así como a la distribución del área bajo la curva, mostró que los datos no tienen una distribución normal, tanto en condiciones control como bajo el tratamiento de bicuculina.

Las distribuciones de la actividad celular muestra que la mayoría de las células tienen transitorios espontáneos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  de baja frecuencia y área bajo la curva menor, a diferencia de lo que se observa en la minoría de las células, las cuales presentan actividad espontánea de mayor frecuencia y mayor amplitud, lo cual indica que las células cromafines *in situ* tienen patrones distintos de actividad.

Una vez observadas las características de los datos, la comparación estadística se realizó con la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, una prueba no paramétrica para comparar la media de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas sin suponer ningún tipo de distribución en particular. Esta prueba, calcula el tamaño de las diferencias producidas por un tratamiento en cada sujeto (cada célula) y además la dirección del efecto si este fuera positivo o negativo. Este análisis mostró que la aplicación de bicuculina (antagonista del receptor  $\text{GABA}_A$ ) incrementó significativamente ( $p < 0.000$ ,  $n=4$ ) la frecuencia y el área bajo la curva de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ .



**FIGURA 14. Distribución de la frecuencia absoluta de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  y área bajo la curva de las células cromafines de la rebanada de glándula adrenal. A.** Distribución de la frecuencia absoluta de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  en condiciones control y bajo el tratamiento de bicuculina. **B.** Distribución de la frecuencia absoluta del área bajo la curva en condiciones control y bajo el tratamiento de bicuculina. **C.** La aplicación del antagonista de receptores  $GABA_A$ , bicuculina, incrementan significativamente la frecuencia y área bajo la curva de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  (**D**). El valor de P de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon,  $p < 0.0001$ ,  $n = 4$  rebanadas.

Estos resultados son una evidencia de la presencia del GABA endógeno en el microambiente celular de la rebanada de la glándula adrenal, que participa en la inhibición tónica de las fluctuaciones espontáneas del  $Ca^{2+}_i$ . Sin embargo, la despolarización que induce la activación de los receptores  $GABA_A$  por muscimol, solo se puede explicar por un mecanismo dual del GABA endógeno.

El primer mecanismo es el incremento en el  $Ca^{2+}_i$  inducido por la activación de receptores  $GABA_A$  por muscimol, coincide con un posible efecto directo sobre los receptores  $GABA_A$  en las membranas de las células cromafines, ya que efectos similares se han observado en células en cultivo y sin embargo, no se puede

descartar que el GABA endógeno también este afectando a estos receptores GABA<sub>A</sub> en las membranas de las células cromafines.

El segundo es la activación del receptor GABA<sub>A</sub> por el GABA endógeno que inhibe de manera tónica los transitorios de Ca<sup>2+</sup> espontáneos o los que pudieran haber sido generados por estímulos colinérgicos, aun en células donde la estimulación de los receptores GABA<sub>A</sub> por muscimol resultaron en un incremento del Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, esto se podría explicar por la presencia de receptores GABA<sub>A</sub> que se pudieran encontrar en las terminales nerviosas, pre-sinápticas.

### **6.5 El incremento de los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducidas por el bloqueo de receptores GABA<sub>A</sub> es dependiente de la activación de receptores nicotínicos.**

Se ha reportado que las consecuencias de la activación de receptores GABA<sub>A</sub> varían considerablemente dependiendo de su localización. Por ejemplo, la activación de receptores GABA<sub>A</sub> inhibe la secreción en terminales nerviosas de la medula espinal, retina, corteza olfatoria y pituitaria posterior (Zhang y Jackson, 1995). En la preparación de rebanada de glándula adrenal, las terminales nerviosas mantienen su estructura y su actividad sobre las células cromafines (Kajiwara *et al*, 1997). Por lo tanto, no se descarta que el GABA endógeno pueda estar activando receptores GABAérgicos en las pre-sinapsis, al igual que como sucede en otros tejidos antes mencionados y que de esa forma regulen la actividad de las pre-sinapsis colinérgicas que inervan a las células cromafines.

Uno de los principales efectos de la acetilcolina (ACh) liberada por las pre-sinapsis de las células cromafines es promover la activación de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR) post-sinápticos. Y la activación de estos receptores induce potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSPs, por sus siglas en inglés), los cuales pueden llevar a la generación de uno o más potenciales de acción. El incremento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción aumenta la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los canales de calcio dependientes de voltaje y por lo tanto, genera un aumento rápido de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. De esta manera, si se altera la generación de los EPSP debido a que se modifica la secreción de ACh por un efecto directo (inhibición por activación de receptores GABA<sub>A</sub> por el GABA endógeno) en las



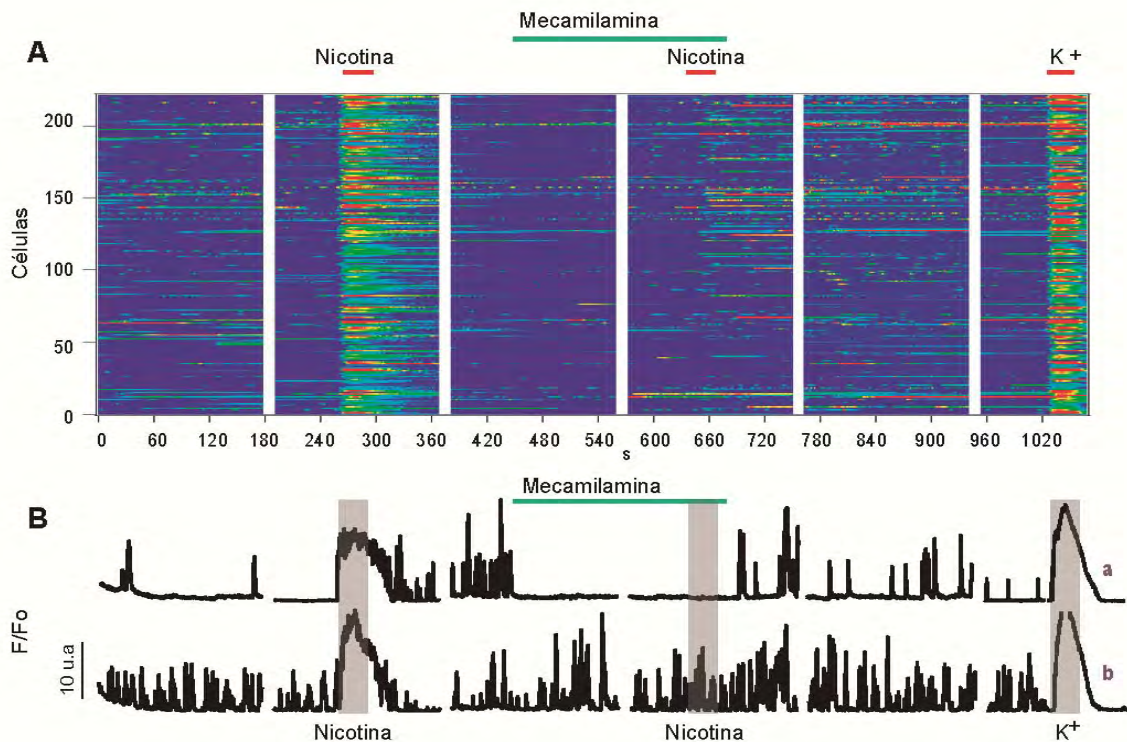
terminales pre-sinápticas, el efecto podría manifestarse en los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$  de las células cromafines.

Para probar esta hipótesis se caracterizó la respuesta de la estimulación de los receptores nAChR y la posibilidad de que la ACh proveniente de las terminales sinápticas en el microambiente celular mantenga a los nAChR tónicamente activos. Para esto, a través del sistema de perfusión a partir del segundo 35 durante 15 segundos, se aplicó nicotina (10  $\mu\text{M}$ ), un agonista específico de nAChR, en la rebana de glándula adrenal.

Los resultados mostraron que en el 100% de las células viables, la nicotina produce un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}_i$ . En el 100% de las células cromafines este incremento fue inhibido después de la aplicación de Mecamilamina (20  $\mu\text{M}$ ), un antagonista específico de nAChR (Fig. 15A).

Al caracterizar el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores nAChR activados por nicotina, se evaluó el efecto de la ACh liberada de las terminales espláncicas en los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$  en presencia de mecamilamina, se observó que solo en el  $18 \pm 4\%$  del total de las células cromafines se inhibieron los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ . En el  $82 \pm 4\%$  de las células cromafines restantes no se observó ningún cambio en el patrón de los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$ , en comparación con la secuencia de imágenes control. Estos resultados indican que la ACh liberada espontáneamente de las pre-sinapsis, induce la generación de transitorios de  $\text{Ca}^{2+}_i$  solo en el 20% de las células cromafines en la rebanada de glándula adrenal de rata.

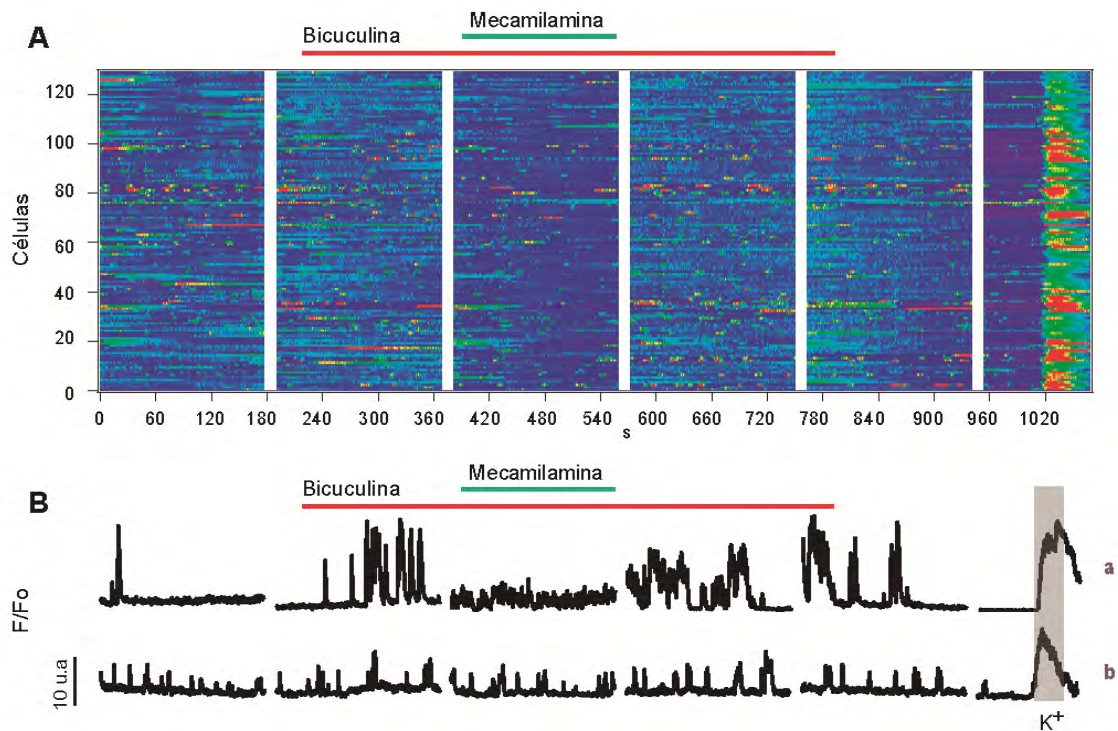
En la preparación de rebanada de glándula adrenal, las terminales nerviosas mantienen su estructura y su actividad sobre las células cromafines (Kajiwara *et al*, 1997). Sin embargo, estos resultados sugieren que un bajo porcentaje de la liberación tónica de ACh por las terminales pre-sinápticas contribuyen a mantener la actividad del  $\text{Ca}^{2+}_i$  en las células cromafines. Esto podría explicarse si la actividad de estas terminales pre-sinápticas se encuentra inhibida tónicamente por la activación de receptores  $\text{GABA}_A$  por el GABA endógeno.



**FIGURA 15. La estimulación de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  por activación de nAChRs por ACh endógena. A.** Grafica tipo raster, donde se hace el seguimiento en el tiempo en segundos (eje x) de la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas obtenidas (células, eje y) en cada secuencia de imágenes. En la gráfica se muestra que el incremento en el  $Ca^{2+}_i$  en las células cromafines ocurre por la estimulación de receptores nAChR con nicotina, dicho efecto se bloqueó por la aplicación de su antagonista específico mecamilamina. **B.** Trazos representativos de dos células que muestran un incremento en el  $Ca^{2+}_i$  en respuesta a la estimulación del receptor nAChR con nicotina (trazos **a** y **b**), el cual fue bloqueado por el tratamiento con mecamilamina. El trazo superior es representativo de una célula cromafin donde el bloqueo de los receptores nAChR induce un efecto inhibitorio en la actividad espontánea del  $Ca^{2+}_i$  (**a**), el trazo inferior es representativo de una CC donde el bloqueo de los receptores nAChR no tiene efecto en los transitorios espontáneos de  $Ca^{2+}_i$ .

Para probar esta hipótesis se estimuló el incremento de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  por la aplicación de bicuculina, y para corroborar que los transitorios incrementados dependen de la estimulación colinérgica se bloquearon los receptores nAChR con su antagonista específico, mecamilamina. Los resultados mostraron que la facilitación de los transitorios espontáneos de  $Ca^{2+}_i$  inducidos por el bloqueo de los receptores  $GABA_A$  con bicuculina, son dependientes de la activación de nAChR debido a que al bloquearlos con su antagonista específico mecamilamina, se previno la facilitación de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  inducidos por bicuculina en el 100% de las células. Por lo tanto el GABA endógeno podría estar activando receptores  $GABA_A$  en las pre-

sinapsis inhibiéndolas tónicamente (inhibición pre-sináptica) y frenando la liberación de ACh, de esta manera inhibe indirectamente la generación de transitorios de  $Ca^{2+}_i$  en las células cromafines (Fig. 16).



**FIGURA 16. El incremento de los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  inducido por el bloqueo de receptores  $GABA_A$  se previene por el bloqueo de receptores nAChR. A.** Grafica tipo raster, donde se hace el seguimiento en el tiempo en segundos (eje x) de los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas obtenidas (células, eje y) en cada secuencia de imágenes. Donde se muestra que el incremento en los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  por el bloqueo de la actividad de los receptores  $GABA_A$  inducida por el GABA endógeno se inhibe por la aplicación de mecamilamina. **B.** En el trazo superior se muestra el seguimiento de la intensidad de fluorescencia de una célula cromafin representativa donde la aplicación de bicuculina induce incrementos en los transitorios de  $Ca^{2+}_i$  y estos se inhiben en presencia de mecamilamina (a). En el trazo inferior, la intensidad de fluorescencia de una célula cromafin representativa con actividad espontánea que no muestra ningún efecto por la aplicación de bicuculina, tampoco se modifican los transitorios espontáneos por aplicación de mecamilamina (b), n=4 rebanadas.

Estos resultados sugieren que el GABA endógeno inhibe la actividad celular, ya sea que esta inhibición pueda ser a nivel de las terminales nerviosas que se conservan en la rebanada de glándula adrenal, en consecuencia, la secreción de ACh es modulada por el GABA endógeno y/o si la inhibición es a nivel de receptores GABA<sub>A</sub> en las post-sinapsis, también se encontraría inhibiendo la entrada pre-sináptica colinérgica. Por lo tanto, el GABA endógeno puede tener grandes consecuencias sobre la actividad celular, y sobre la secreción de catecolaminas al torrente sanguíneo.

## 7 Discusión

Los resultados de este trabajo mostraron que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> por su agonista, muscimol, induce el incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en casi el 50% de las células cromafines, así como la probable inhibición de la actividad espontánea en un 8% de las células. Se concluyó que la actividad espontánea o la falta de ella en las células cromafines no está relacionada con el incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en respuesta a la activación de receptores GABA<sub>A</sub>. Se confirmó que muscimol puede inducir la despolarización del potencial de membrana en 3 de 10 células registradas. Y que el incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en respuesta a la activación de receptores GABA<sub>A</sub> es dependiente de Ca<sup>2+</sup> extracelular. La inhibición de los receptores GABA<sub>A</sub>, mostró el efecto del GABA endógeno en la actividad del Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, la inhibición tónica de las señales de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducidas por estímulos colinérgicos, lo que sugiere la inhibición tónica de la secreción de catecolaminas.

La idea central de este estudio fue tratar de elucidar cómo se lleva a cabo la modulación de las señales de Ca<sup>2+</sup> por la activación del receptor GABA<sub>A</sub> por el GABA endógeno en células cromafines en rebanadas de glándula adrenal. Esta es una preparación que mantiene el medio ambiente celular, las interacciones entre las células para responder coordinadamente a una condición de estrés y por lo tanto facilita el estudio de moléculas moduladoras endógenas.

Se ha propuesto que los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en las células cromafines determinan en gran parte la función de la glándula adrenal. De manera importante se sabe que estas señales son moduladas autócrina y parácrinamente por diferentes factores como ATP y opioides, que son co-secretados en conjunto con las catecolaminas (CA) (Dunlap y Fischbach, 1981). La liberación de CA es inducida por la actividad eléctrica espontánea o en respuesta a un estímulo fisiológico colinérgico en las células cromafines. La estimulación colinérgica induce el incremento en la concentración de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>, lo cual promueve la liberación de catecolaminas y de moléculas co-secretadas, entre ellas GABA (Oset-Gasque *et al.*, 1990). De esta manera el GABA endógeno puede actuar autócrina y/o parácrinamente al unirse a sus receptores y regular el potencial de membrana induciendo o no la activación de los canales de calcio sensibles a voltaje.

Bajo este supuesto, se puede proponer que durante una condición de estrés agudo, físico o emocional, la activación del nervio esplácnico promueve un aumento de la exocitosis de catecolaminas en las células cromafines y al mismo tiempo un aumento en la liberación de las sustancias contenidas en los gránulos cromafines, entre ellos el GABA. Por lo tanto, habrá más GABA en el medio extracelular que podría tener una función específica durante la estimulación colinérgica de las células cromafines, y otra diferente durante el reposo. Como los efectos que describió Kataoka en 1986 y Matsuoka en 2008, donde muestran que el GABA exógeno durante la estimulación colinérgica puede inducir inhibición de las señales de  $Ca^{2+}_i$  en las células cromafines, o los descritos por Kitayama en 1990 donde GABA facilita la excitación de las células cromafines inducida por ACh, o donde Xie en 2003 describe que el GABA no tiene efecto durante la estimulación de los receptores colinérgicos inducida por aplicación extracelular de ACh.

A excepción de Matsuoka, la mayoría de los trabajos preliminares donde se investigó el sistema GABAérgico en células cromafines, fueron realizados en condiciones de cultivo. Estos trabajos exponen un amplio panorama de los posibles efectos de la estimulación conjunta de los receptores nAChR y GABAérgicos ( $GABA_A$ ) por sus agonistas en las células cromafines. A pesar de los diferentes resultados obtenidos, se discute que durante la despolarización inducida por ACh, la estimulación de receptores  $GABA_A$  debería promover una hiperpolarización, debido a que el potencial de equilibrio del  $Cl^-$ , a pesar de ser menos negativo con respecto al potencial de reposo de la células cromafines, es negativo con respecto a la despolarización inducida por la ACh (Fujimoto *et al.* 1987; Kataoka *et al.* 1986, Matsuoka *et al.*, 2008).

Estas hipótesis han sido difíciles de demostrar probablemente por diferencias en los parámetros de estimulación utilizados y/o a que los estudios están enfocados a un solo tipo de respuesta celular; para todos estos trabajos únicamente se tomaron en cuenta a las células que respondieron con incremento de  $Ca^{2+}_i$ , como “células con receptor  $GABA_A$ ”. Contrario a esto, en el presente trabajo, se observó que la activación de receptores  $GABA_A$  por su agonista exógeno, muscimol, podría tener distintos tipos de respuestas en las señales de  $Ca^{2+}_i$  en las células cromafines *in situ*, datos que hasta el momento se desconocían. Esta variabilidad en la activación de receptores  $GABA_A$  en las células cromafines a lo largo de la rebanada, se puede

explicar, si solo el porcentaje que responde a la activación del receptor GABA<sub>A</sub> con un incremento en el Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> expresa los receptores y/o si el gradiente de concentración transmembranal de Cl<sub>i</sub> no fuera uniforme en la población de células cromafines de la glándula adrenal, ya que los efectos inducidos por la activación de GABA<sub>A</sub> (depolarización o hiperpolarización) dependen del E<sub>Cl</sub> (Xie *et al.*, 2003).

Otra posibilidad para explicar la variabilidad observada en los efectos de la activación de GABA<sub>A</sub> por sus agonistas, es que dichos efectos puedan variar dependiendo de las concentraciones utilizadas de GABA o muscimol (Nusser *et al.*, 1999; Ramadan *et al.*, 2003). Esto se ha observado en tejidos neuronales, donde la activación del receptor GABA<sub>A</sub> puede regular la inhibición celular de dos maneras diferentes (Bacci *et al.*, 2003). La primera se denomina inhibición “fásica” en la cual la activación de receptores GABA<sub>A</sub> sinápticos inducen corrientes inhibitorias post-sinápticas (IPSCs, por sus siglas en inglés). El segundo caso sugiere que GABA liberado de las pre-sinapsis, puede escapar de las sinapsis y activar receptores GABA<sub>A</sub> extra-sinápticos. A esta condición se le denomina inhibición “tónica”. Para este último caso la concentración extracelular de GABA es crítica. Se ha calculado que la concentración de GABA endógeno, se mantiene en aproximadamente 1 μM de manera basal en algunos núcleos cerebrales como en el hipocampo de rata (Lerma *et al.*, 1986). Para estos casos se ha observado que el control de la estimulación preferentemente de uno u otro sistema (fásico o tónico) depende de la afinidad al GABA de los diferentes tipos de receptores GABA<sub>A</sub>, siendo los receptores involucrados en la inhibición tónica, más sensibles a la activación por GABA que los involucrados en la inhibición fásica (Mody, 2001). De esta forma, cuando se estimula a los receptores exógenamente con altas concentraciones de agonistas (orden micromolar) los receptores que se activan pueden ser farmacológicamente distintos a los que están tónicamente activos (Attwell *et al.*, 1993).

El tejido adrenal puede estar liberando GABA tónicamente durante la actividad basal de las células cromafines (Oset-Gasque *et al.*, 1990). La falta de expresión en el tejido adrenal de transportadores del GABA (GAT) involucrados en la recaptura de GABA (Matsuoka *et al.*, 2008), sugiere que GABA circulante podría tener una difusión facilitada a lo largo del tejido adrenal y mantener una concentración tónica del GABA relativamente elevada. Esto podría inducir una gran influencia reguladora en las funciones de las células cromafines, como la inhibición tónica que se observó

en nuestros experimentos y que se reveló mediante la aplicación de antagonistas específicos de los receptores GABA<sub>A</sub>.

Si la inhibición tónica por el GABA endógeno se ha descrito en otros tejidos neuronales como neuronas hipotálamo (Kim *et al.*, 2011) o en células del hipocampo de rata (Lerma *et al.*, 1986), y se encuentra presente en las células cromafines de la médula adrenal, podría explicar lo que se observó en nuestros experimentos (Fig. 13), donde la activación del receptor GABA<sub>A</sub> por muscimol en las células cromafines induce un incremento en las señales de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> y en las mismas células, la aplicación de un antagonista de GABA<sub>A</sub>, induce un incremento en frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>. En estos tipos de células, la inhibición tónica que induce el GABA endógeno en las células cromafines puede explicarse si la inhibición es a nivel pre-sináptico como sugieren los resultados de esta tesis (Fig. 16), sin embargo, no se descarta la acción post-sináptica de la bicuculina por la diversidad de respuestas en las células cromafines que se encontró en la glándula adrenal.

Se ha discutido que la activación de receptores GABA<sub>A</sub> por GABA casi siempre resulta en inhibición de la actividad neuronal (Zhang y Jackson, 1995). Con los resultados de este trabajo podemos corroborar que GABA endógeno está induciendo inhibición de las señales de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> en el tejido adrenal, esta inhibición puede ser por una inhibición de la secreción de acetilcolina a nivel pre-sináptico o una inhibición tónica por unión a los receptores GABA<sub>A</sub> de las células cromafines.

La inhibición tónica en las células cromafines por el GABA endógeno, puede provocar que los receptores GABA<sub>A</sub> se encuentren constantemente activos y por lo tanto promuevan un cortocircuito en la membrana aumentando la conductancia en la membrana celular como sucede en neuronas granulares cerebelares y del hipocampo (Brickley *et al.*, 1996; Stell y Mody 2002). Ello podría disminuir los efectos de las corrientes excitadoras; así como cambios en el voltaje que podrían mover al potencial de membrana lejos del umbral del potencial de acción y alterar la disposición de canales de calcio sensibles a voltaje (Rudomin y Schmidt, 1999). Esto también podría explicar que el incremento de los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> inducidos por la bicuculina, sean inhibidos antagonizando a los receptores nicotínicos, ya que al eliminar la inhibición tónica, las células cromafines se encontraron disponibles para que los transitorios de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> fueran facilitados por la liberación de ACh.



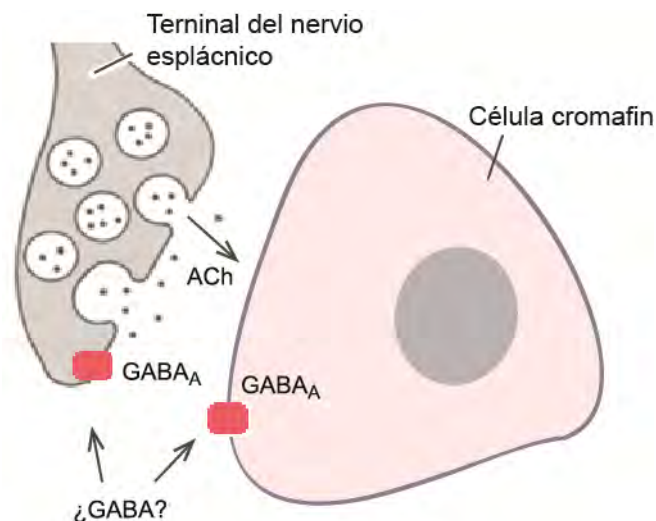
La inhibición tónica en las células cromafines de la glándula adrenal además podría estar relacionada con el tipo de receptores GABA<sub>A</sub> que expresan, cuyas propiedades dependen de las subunidades que contienen y determinan la inhibición tónica GABAérgica (Matsuoka *et al.*, 2008). Esto implica la presencia de receptores GABA<sub>A</sub> de alta afinidad a GABA, que no se desensibilizan ante la constante activación y que además expresen subunidades  $\delta$ , las cuales se han implicado en la regulación de la corriente tónica en neuronas granulares del cerebelo (Nusser *et al.*, 1998; Brickley *et al.*, 2001; Hamann *et al.*, 2002), en células granulares del giro dentado (Overstreet *et al.*, 2001; Stell y Mody 2002).

La inhibición pre-sináptica o la inhibición tónica en las células cromafines de la glándula adrenal por el GABA, sugieren nuevos mecanismos para la regulación de la excitabilidad celular. De esta forma el sistema GABAérgico en el tejido adrenal modula la exocitosis de las catecolaminas en función de la concentración de GABA endógeno.

## 8 Conclusión

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

El GABA endógeno ejerce efectos moduladores sobre la actividad de  $Ca^{2+}_i$  en las células cromafines *in situ*, durante el reposo (actividad espontánea), así como durante la estimulación colinérgica. El uso de la rebanada de tejido adrenal que asemeja el ambiente tisular intacto, nos permitió demostrar la función parácrina del GABA endógeno, mismas que están sustentadas por evidencias como la producción y el almacenamiento de GABA en los gránulos cromafines, por las diferentes subunidades de los recetores  $GABA_A$  y la ausencia de GATs y GABA-T. Además se comprobó que el GABA endógeno desempeña una función parácrina regulando las señales de calcio de las células cromafines. Esta regulación fisiológicamente se traduce en inhibición tónica en las pre-sinapsis y/o post-sinapsis producida por el cortocircuito, o en la despolarización tónica inducida por el GABA endógeno, lo cual puede estar regulando la excitabilidad celular tanto espontánea como la inducida por la estimulación colinérgica y en consecuencia la secreción basal y estimulada de catecolaminas.



**Figura 17.** Modelo de la regulación fisiológica que ejerce GABA endógeno en las pre-sinapsis y/o post-sinapsis de la glándula adrenal de rata.

## 9 Bibliografía

- Ahlquist R.** (1948) A study of the adrenotropics receptors. Capítulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Albillos A, Carbone E, Gandia L, Garcia A y Pollo A.** (1996) Opioid inhibition of Ca<sup>2+</sup> channel subtypes in bovine chromaffin cells: selectivity of action and voltage-dependence. *Eur J Neurosci* 8: 1561–1570.
- Albillos A, Gandia L, Michelena P, Gilabert J, del Valle M, Carbone E y Garcia A.** (1996) The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 494: 687–695.
- Alvarez-Leefmans F, Gamino S, Giraldez F y Nogueron I.** (1988) Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. *J Physiol* 406: 225–246.
- Attwell D, Barbour B y Szatkowski M.** (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11: 401–407, 11.
- Artelejo A.** (1995) Electrical Properties of Adrenal Chromaffin Cells. Capítulo 12 en: “The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells”. Scherübl H y Hescheler J Editores. CRC press.
- Bacci A, Rudolph U, Huguenard J y Prince D.** (2003) Major differences in inhibitory synaptic transmission onto two neocortical interneuron subclasses. *J. Neurosci.* 23, 9664–9674 (2003).
- Bayliss D, Sirois J y Talley E.** (2003) The TASK family: two-pore domain background K<sup>+</sup> channels. *Mol Interv* 3:205–219.
- Ben-Ari Y.** (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3: 728–739.
- Becherer U, Moser T, Stümer W, Oheim M.** (2003) Calcium Regulates Exocytosis at the Level of Single Vesicles. *Nat. Neurosci.* 8: 846-853.
- Bernard C.** (1855) Remarques sur la sécrétion de sucre dans le foie faites à l’occasion de la communication de M. Lehmann. C. Capítulo 9 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Barnard E, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson A y Langer S.** (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of  $\gamma$ -aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50, 291–313.
- Berridge M, Bootman D y Roderick H.** (2003) Calcium Signalling: Dynamics, homeostasis and Remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul; 4(7):517-29.
- Bigornia L, Allen C, Jan C, Lyon R, Titeler M y Schneider A.** (1990) D2 dopamine receptors modulate calcium channel currents and catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252, 586–592.
- Blaschko H.** (1973) Catecholamine biosynthesis. Capítulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Borle B.** (1981) Control, modulation and regulation of cell calcium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 190:13–153.
- Bormann J y Clapham D.** (1985) c-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2168–2172
- Brickley S, Cull-Candy G, y Farrant M.** (1999) Singlechannel properties of synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors suggest differential targeting of receptor subtypes. *J. Neurosci.* 19, 2960–2973.

- Brickley S, Cull-Candy S y Farrant M.** (1996) Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA<sub>A</sub> receptors. *J. Physiol. (Lond.)* 497, 753–759.
- Burgoyne R y Morgan A.** (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83: 581–632.
- Burnstock G.** (1987) Mechanisms of interaction of peptide and nonpeptide vascular neurotransmitter systems. Capítulo 11 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Cannon W.** (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9: 399–431.
- Carbone E y Garcia A.** (1996) The mechanism of calcium channel facilitation in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 494: 687–695.
- Caron P, Cote L y Kremzner L.** (1988) Putrescine, a source of gamma-aminobutyric acid in the adrenal gland of the rat. *Biochem J* 251:559–562.
- Castro E, Oset-Gasque M, Caradas S, Gimenez A y Gonzalez M.** (1988) GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> sites in bovine adrenal medulla membranes. *J. Neurochem. Res.*, 20, 241-245.
- Castro E, Oset-Gasque M y Gonzalez M.** (1989) GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors are functionally active in the regulation of catecholamine secretion by bovine chromaffin cells. *J Neurosci Res* 23: 290–296.
- Choi H, Lee C, Schroeder A, Kim Y, Jung S, Kim J, Kim D, Son E, Han H, Hong S, Colwell C y Kim Y.** (2008) Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 28, 5450–5459.
- Coupland R.** (1972) The chromaffin system. In Blaschko H, Mucoll E. eds *Catecholamines, Handbook of Experimental*. Vol 33. Berlin: Springer-Verlag: 16-39.
- Coupland R.** (1965) The natural history of the chromaffin cell. Longmans, London.
- Douglas W y Rubin P.** (1961) The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40–57.
- Douglas W.** (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34: 453–474.
- Dunlap K y Fischbach G.** (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol* 317: 519–535.
- Eränkö O.** (1952) On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta. Anat* 16, suppl.: 17: 1-60.
- Eustachius B.** (1774) *Tabulae Anatonicae*. Lancisius B. Capítulo 10 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Farrant M y Nusser Z.** (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA<sub>A</sub> receptor. *Nat Rev Neurosci* 6, 215–229.
- Fenwick E, Fajdiga P, Howe N y Livett b.** (1978) Funcional and Morphologicas characterization of isolated bovine adrenal medullary cells. *J. Cell Biol.* 76: 12-30.
- Fenwick E, Marty A y Neher E.** (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 331, 577–597.
- Fujimoto M, Kataoka Y, Guidotti A, and Hanbauer I.** (1987) Effect of gammaaminobutyric acidA receptor agonists and antagonists on the release of enkephalin-containing peptides from dog adrenal gland. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 195–199.
- Garcia A y Carbone E.** (1996) Calcium-current facilitation in chromaffin cells. *Trends Neurosci* 19: 383–385.
- García A, García-De-Diego A, Gandía L, Borges R y García-Sancho J.** (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86:1093-131.

- González M, Oset-Gasque M, Castro E, Bugeda J, Arce C y Parramón M.** (1992). Mechanism through which GABA<sub>A</sub> receptor modulates catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 47, 487–494.
- Guérineau N, Desarménien M, Carabelli V y Carbone E.** (2012) Funcional Chromaffin Cell Plasticity in Response to Stress: Focus on Nicotinic, Gap Junction, and Voltage-Gated. *J Mol Neurosci* Oct 48(2):368-86
- Hamann M, Rossi J y Attwell D.** (2002) Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron* 33, 625–633.
- Hamaji M, Miyata M y Kawasshima Y.** (1985) A study of the vascular arrangement of the rat adrenal gland using non-radioactive microspheres. Capitulo 11 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Hamann M, Rossi D y Attwell D.** (2002) Tonic and spillover inhibition of granule cells control information flow through cerebellar cortex. *Neuron* 33, 625–633.
- Harada K, Matsuoka H, Nakamura J, Fukuda M y Inoue M.** (2010) Storage of GABA in chromaffin granules and not in synaptic-like microvesicles in rat adrenal medullary cells. *J Neurochem* 114:617–626.
- Harada K, Matsuoka H, Sata T, Warashina A y Masumi Inoue.** (2011) Identification and Role of Muscarinic Receptor Subtypes Expressed in Rat Adrenal Medullary Cells. *J Pharmacol Sci* 117, 253 – 264.
- Heinsimer J y Lefkowitz R.** (1982) Adrenergic receptors: biochemistry, regulation, molecular mechanism, and clinical implications. Capitulo 11 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Hille B.** (1992) G protein-coupled mechanisms and nervous signaling. *Neuron* 9: 187–195.
- Hille B.** (2001) Ions channels of excitable membranes. 3ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hollins B y Ikeda S.** (1996) Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol* 76: 1195– 1211.
- Holzbauer M, Birmingham M, De Nicola A y Oliver J.** (1985). In vivo secretion of 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one, a potent anaesthetic steroid, by the adrenal gland of the rat. *J Steroid Biochem* 22, 97–102.
- Huber K, Kalcheim C y Unsicker K.** (2009) The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest, *Auton. Neurosci* 151(1):10-6.
- Inoue M, Harada K, Matsuoka H, Sata T y Warashina A.** (2008) Inhibition of TASK1-like channels by muscarinic receptor stimulation in rat adrenal medullary cells. *J Neurochem*. 106:1804–1814.
- Insel P.** (1984) Identification and regulation of adrenergic receptor in target cells. Capitulo 11 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish M y Iijima T.** (1997) Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol* 47:449-64.
- Kandel E, Schwartz J y Jessell T.** (2000) Principles of neural science, Mcgraw-Hill Publ.Comp.; Edición: 4.
- Kataoka Y, Gutman Y, Guidotti A, Panula P, Wroblewski J, Cosenza-Murphy D, Wu J y Costa E.** (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:3218 –3222.
- Kataoka Y, Fujimoto M, Alho H, Guidotti A, Geffard M, Kelly G y Hanbauer I.** (1986) Intrinsic gamma aminobutyric acid receptors modulate the release of catecholamine from canine adrenal gland in situ. *J Pharmacol Exp Ther* 239:584–590.
- Khawaled R, Bruening-Wright A, Adelman J y Maylie J.** (1999) Bicuculline block of small-conductance calcium-activated potassium Channels. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 438:314–321

- Kim J, Kim W, Kim Y, Lee Y, Kim Y, Shen F, Lee S, Park D, Choi H, Hur J, Park J, Han H, Colwell C, Cho Y y Kim Y.** (2011) Chronic hyperosmotic stress converts GABAergic inhibition into excitation in vasopressin and oxytocin neurons in the rat. *J. Neurosci.* 31, 13312–13322.
- Kitayama S, Morita K, Dohi T y Tsujimoto A.** (1984) The nature of the stimulatory action of gamma-aminobutyric acid in the isolated perfused dog adrenals. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 326: 106–110.
- Kitayama S, Morita K, Dohi T y Tsujimoto A.** (1990) Enhancement by GABA of the stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 341, 414–418.
- Kleppisch T, Ahnert-Hilger G, Gollasch M, Spicher K, Hescheler J, Schultz G y Rosenthal W.** (1992) Inhibition of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels via  $\alpha 2$ -adrenergic and opioid receptors in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Arch* 421: 131–137.
- Kohn A.** (1902) Das chromaffine Gewebe. Capitulo 10 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company.
- Kullmann D, Ruiz A, Rusakov D, Scott R, Semyanov A y Walker M.** (2005) Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABA receptors in the CNS: where and why? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 87, 33–46.
- Landsberg L y Young J.** (1980) Catecholamines and the adrenal medulla. En: Bondy P. K., Rosenberg L. E., eds. *Metabolic control and Disease*. 8<sup>th</sup> ed Philadelphia: W. B. Saunders: 1621-1693.
- Landsberg L.** (1976) Catecholamines and the sympathoadrenal system. En Ingbar S. H., *The year in Endocrinology*. New York: Plenum: 177-231.
- Le Douarin N y Teillet M.** (1974) Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. Capitulo 10 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Lerma J, Herranz A, Herreras O, Abraira V y Martin del Rio R.** (1986) In vivo determination of extracellular concentration of amino acids in the rat hippocampus. A method based on brain dialysis and computerized analysis. *Brain Res.* 384, 145-155.
- Lingle C, Solaro C, Prakriya M y Ding P.** (1996) Calcium-activated potassium channels in adrenal chromaffin cells. *Ion Channels* 4, 261–301.
- Lockhart R, Hamilton G y Fyfe F.** (1988) *Anatomía humana; traducción Alberto Folch y Pi y Homero Vela*. Ed. Interamericana. México.
- Malgaroli A, Fesce R y Meldolesi J.** (1990) Spontaneous  $[Ca^{2+}]_i$  fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 2,4,5-triphosphate elevations but are generated by caffeine and ryanodine-intracellular  $Ca^{2+}$  store. *J. Biol. Chem.* 265(6): 3005-3008.
- Martin del Rio R y Caballero A.** (1980) Presence of gamma-aminobutyric acid in rat ovary. *J Neurochem* 34:1584–1586.
- Matsuoka H, Harada K, Endo Y, Warashina A, Doi Y, Nakamura J y Inoue M.** (2008) Molecular mechanisms supporting a paracrine role of GABA in rat adrenal medullary cells. *J Physiol* 586:4825–4842.
- Micheletti M, Brioschi A, Fesce R y Grohovaz F.** (2005) A novel pattern of fast calcium oscillations points to calcium and electrical activity cross-talk in rat chromaffin cells *Cell Mol Life Sci.* Jan;62(1):95-104.
- Millhorn D y Hokfelt T.** (1988) Chemical messengers and their coexistence in individual neurons. Capitulo 11 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Mody, I.** (2001) Distinguishing between GABA receptors responsible for tonic and phasic conductances. *Neurochem. Res.* 26, 907–913.

- Neher E.** (1998) Vesicle pools and  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389–399.
- Nusser Z, Sieghart W y Mody I.**(1999) Differential regulation of synaptic GABAA receptors by cAMP-dependent protein kinase in mouse cerebellar and olfactory bulb neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 521, 421–435 (1999).
- Nusser Z, Sieghart W y Somogyi P** (1998). Segregation of different GABA<sub>A</sub> receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells. *J Neurosci* 18, 1693–1703.
- Oomori Y, Iuchi H, Nakaya K, Tanaka H, Ishikawa K, Satoh Y y Ono K.** (1993) Gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in the mouse adrenal gland. *Histochemistry* 100: 203–213.
- Oset-Gasque M, Castro E y González M.** (1990) Mechanisms of [3H] c-aminobutyric acid release by chromaffin cells in primary culture. *J Neurosci Res* 26:181–187.
- Overstreet L. Westbrook G y Jones M.** in *Transmembrane Transporters* (ed. Quick, M. W.) 259–275 (Wiley–Liss Inc., Hoboken, New Jersey, 2002).
- Owens D y Kriegstein A.** (2002) Is there more to GABA thansynaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715–727.
- Perlman R y Chalfie M.** (1977) Catecholamine release from the adrenal medulla. Capitulo 10 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Peters J, Lambert J y Cottrell G.** (1989). An electrophysiological investigation of the characteristics and function of GABAA receptors on bovine adrenomedullary chromaffin cells. *Pflugers Arch* 415, 95–103.
- Petrovic J, Walsh P, Thornley K, Miller C y Wightman R.** (2010) Real-time monitoring of chemical transmission in slices of the murine adrenal gland *Endocrinology*. Apr; 151(4):1773-83.
- Pollet R y Levey G.** (1980) Principles of membrane receptor physiology and their application to clinical medicine. Capitulo 11 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Rae J, Cooper K, Gates P y Watsky M.** (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37: 15-26.
- Ramadan E, Fu Z, Losi G, Homanics G, Neale J y Vicini S.** (2003) GABAA receptor  $\beta$ 3 subunit deletion decreases  $\alpha$ 2/3 subunits and IPSC duration. *J. Neurophysiol.* 89, 128–134.
- Rudomin P y Schmidt R.** (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Exp Brain Res* 129, 1–37.
- Sangiah S, Borowitz J y Yim G.** (1974) Actions of GABA, picrotoxin and bicuculline on adrenal medulla. *Eur J Pharmacol* 27: 130–135.
- Schäfer E.** (1895) Address in physiology on internal secretions. Capitulo 9 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Schegel W y Mollard P.** (1995) Electrical activity and stimulus-secretion coupling in neuroendocrine cells. Capitulo 3 en: “The electrophysiology of Neuroendocrine cells”. Scherubl H y Hescheler J. Editores, CRC press.
- Scoenwetter H.** (1968) Zur Vorgeschichte der Endokrinologie. Capitulo 10 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Stell B. y Mody I.** (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABAA conductances in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22, RC223.
- Staley K, Smith R, Schaack J, Wilcox C, y Jentsch T.** (1996) Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 17: 543–551.

- Teillet M y Le Douarin N.** (1974) Determination of the level of the origin of the adrenal medulla cells in the neural axis using heterospecific grafts of quail neural rudiments on chick embryos. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Tipton K.** (1973) Biochemical aspects of monoamine oxidase. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Tischler A.** (2002) Chromaffin cells as Model of Endocrine Cells and Neurons. Ann. NY Acad. Sci. 971: 366-370.
- Trifaró J, bander M y Doucet J.** (1985) Chromaffin cell cytoskeleton; it is possible role in secretion. Can J Biochem Cell Biol. Jun; 63 (6): 661 -79.
- Twitchell W y Rane S.** (1993) Opioid peptide modulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> and voltage-activated Ca<sup>2+</sup> currents in bovine adrenal chromaffin cells. Neuron 10, 701–709.
- Vandael D, Mahapatra S, Calorio C, Marcantoni A y Carbone E.** (2012) Cav1.3 and Cav1.2 channels of adrenal chromaffin cells: Emerging views on cAMP/cGMP-mediated phosphorylation and role in pacemaking. Biochimica et Biophysica Acta 1828, 1608–1618.
- Verdugo D.** (2005) Médula suprarrenal. Capítulo 50 en: “Fisiología Médica”. Drucker C. Editorial El Manual Moderno, México.
- Viveros O, Wilson S y Chang K.** (1982) Regulation of synthesis and secretion of enkephalins and related peptides in adrenomedullary Chromaffin cells and human pheochromocytoma. In: Costa E., Trabucchi M., eds. Regulatory Peptides: From Molecular Biology to function. New York: Raven, 217-224.
- Winkler H y Westhead E.** (1980) The molecular organization of adrenal chromaffin granules. Neuroscience; 5(11):1803-23.
- Wurtman R y Axelrod J.** (1966) Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Xie Z, Currie K, Cahill A y Fox A.** (2003) Role of Cl<sup>-</sup> co-transporters in the excitation produced by GABA<sub>A</sub> receptors in juvenile bovine adrenal chromaffin cells. J Neurophysiol 90, 3828–3837.
- Yoshimasa T, Nakao K y Ohtsuki H.** (1982) Methionine- and leucine- enkephalin in human sympathoadrenal system and pheochromocytoma. Capitulo 11 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8<sup>th</sup> edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Zhang S y Jackson M.** (1995) GABA<sub>A</sub> receptor activation and the excitability of nerve terminals in the rat posterior pituitary. J Physiol 483:583–595.
- Zhou, Z. y Neher, E.** (1993) Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. Pflugers Arch 425, 511–517.