



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS:

**IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN EL TRANSCRITO DE LA
CONEXINA 36 EN LA GLÁNDULA SUPRARRENAL DEL RATÓN
DURANTE LA VIDA PRENATAL Y PERINATAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ALBERTO ZARZA VELA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

VOCAL: Profesor: Dr. Euclides Avila Chávez

SECRETARIO: Profesor: Dra. Elia Martha Pérez Armendariz

1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Profesor: Dra. Aurora Lara Núñez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE SINAPSIS ELÉCTRICAS. UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN MEDICINA
EXPERIMENTAL.**

TORRE DE INVESTIGACIÓN 5TO PISO, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Elia Martha Pérez Armendariz

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. CRISTINA CORONEL CRUZ

SUSTENTANTE:

Alberto Zarza Vela

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Sistema Nervioso Autónomo	3
3.2. La glándula suprarrenal	3
3.3. Secreción de hormonas esteroideas en la corteza suprarrenal	5
3.4. Producción de hormonas y otros transmisores químicos en las células cromafines de la médula suprarrenal	7
3.4.1. Biosíntesis de catecolaminas	8
3.4.2. Secreción de catecolaminas	10
3.4.3. Efectos fisiológicos de las catecolaminas	11
3.5. Desarrollo fetal de la glándula suprarrenal	13
3.5.1. Corteza fetal	13
3.5.2. Médula fetal	14
3.6. Producción y efectos de hormonas esteroideogénicas y catecolamínicas de la glándula suprarrenal fetal y perinatal	15
3.6.1. Hormonas esteroideogénicas	15
3.6.2. Cortisol fetal	16
3.6.3. Catecolaminas fetales	17
3.7. Mecanismos celulares que incrementan la producción de catecolaminas perinatales inducida por hipoxia	18
3.8. Uniones comunicantes	20
3.8.1. Estructura y composición	20
3.8.2. Funciones generales que llevan a cabo las uniones comunicantes	25
3.8.3. Patología asociada a conexinas	26
3.9. Uniones comunicantes en la glándula suprarrenal	28
3.9.1. Expresión de conexinas en células cromafines del sujeto adulto	28
3.9.2. Acople eléctrico entre células cromafines adultas	28
3.9.3. Expresión de conexinas en las células cromafines durante el desarrollo fetal y perinatal	29

3.9.4. Canales de unión comunicante y exocitosis de catecolaminas en la médula suprarrenal	31
3.9.5. Interacción entre la transmisión sináptica y el acople por unión comunicante	32
3.9.6. Uniones comunicantes y glándula suprarrenal en condiciones de cambios en el estrés fisiológico	34
3.9.6.1. Durante el parto	34
3.9.6.2. En condiciones de estrés por frío	35
4. ANTECEDENTES	36
5. JUSTIFICACIÓN	37
6. HIPÓTESIS	38
7. OBJETIVOS	38
8. MATERIALES Y MÉTODOS	39
9. RESULTADOS	45
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
11. CONCLUSIÓN	53
12. REFERENCIAS	54

1. ABREVIATURAS

A	Adrenalina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Ca²⁺	Ion calcio
-COOH	Carboxilo terminal
Cx	Conexina
Cxs	Conexinas
Da	Dalton
DHEA	Deshidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de deshidroepiandrosterona
DPC	Día postcoito
DPP	Día postparto
ETOH	Alcohol etílico
K⁺	Ion potasio
Na⁺	Ion sodio
NA	Noradrenalina
NH₂⁻	Amino terminal
nm	Nanómetro
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SG	Semana de gestación
UC	Uniones comunicantes
V_j	Diferencia de potencial
ZF	Zona fasciculada
ZG	Zona glomerulosa
ZR	Zona reticular
ZT	Zona transicional

2. RESUMEN

Los canales intercelulares permiten la transferencia directa de iones y segundos mensajeros entre células adyacentes. En los vertebrados, estos canales están formados principalmente por una familia de proteínas llamadas conexinas (Cxs), integrada por 20 genes en el ratón y 21 en el humano. El hemicanal o conexón está formado por seis conexinas y dos conexones forman un canal intercelular. Se sabe que las células cromafines del ratón adulto están interconectadas por la conexina 36 (Cx36). Además la expresión de la proteína Cx36 en la rata se incrementa durante el estrés en las glándulas suprarrenales, lo cual indica que ésta proteína es relevante para la función de la glándula suprarrenal. También, es bien conocido que la corteza y la médula se organizan durante la etapa fetal temprana y que su función es fisiológicamente relevante durante el desarrollo perinatal. Por estudios de inmunofluorescencia (IF) se sabe que la proteína Cx36 se expresa durante la etapa embrionaria y fetal sugiriendo que ésta se modula con el desarrollo perinatal no obstante, éste posible cambio no ha sido cuantificado. OBJETIVO: Demostrar que el transcrito de la Cx36 se modula durante el desarrollo fetal y perinatal en la glándula suprarrenal de ratón. MÉTODOS: Para determinar los niveles del transcrito de la Cx36, se realizaron estudios de PCR en tiempo real a partir de la transcripción reversa del mRNA de grupos de glándulas suprarrenales a los 13 y 18 días postcoitum (dpc) y a los 3 días posparto (dpp). RESULTADOS: Encontramos que el transcrito de la Cx36 ya se expresa al día 13 dpc y 18 dpc y que ésta expresión aumenta al día 3 dpp, alcanzando a esta última edad una significancia estadística. CONCLUSIONES: Lo anterior demuestra que la Cx36 se modula en una forma dependiente del desarrollo fetal al perinatal, lo que sugiere el papel de esta conexina en la maduración de las células cromafines.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. Sistema Nervioso Autónomo.

El sistema nervioso periférico se divide en dos: el sistema nervioso autónomo (SNA) y el sistema nervioso somático. El SNA se forma de un conjunto de neuronas eferentes que regulan la actividad cardiovascular, digestiva, endocrina, respiratoria y urogenital. El SNA a su vez se divide en el sistema simpático y parasimpático. Las funciones de estos dos sistemas ejercen un efecto contrario generalmente en sus órganos blanco. La división simpática regula el gasto de las reservas energéticas almacenadas en el cuerpo. Las neuronas pre-ganglionares simpáticas se localizan en la sustancia gris de la médula espinal en las regiones torácica y lumbar. Las fibras pre-sinápticas se ramifican y se dirigen hacia los ganglios simpáticos espinales donde hacen relevo sináptico con las neuronas post-ganglionares. Estas últimas hacen sinapsis después con diferentes órganos blanco. Las neuronas post-ganglionares migran de las crestas neurales durante el desarrollo. La médula adrenal constituye un ganglio modificado, ya que las células cromafines reemplazan a las neuronas post-ganglionares (Pocock y Richards, 2002).

3.2. La glándula suprarrenal.

Las glándulas suprarrenales son órganos pareados que cubren la parte superior de cada riñón. Cada glándula suprarrenal consta de una corteza externa y una médula interna que llevan a cabo diferentes funciones. La corteza constituye alrededor del 80 % del volumen total de cada glándula, y en un sujeto adulto está constituida por tres zonas; una zona glomerulosa (ZG) externa, una zona fasciculada (ZF) media y una zona reticular (ZR) interna. Las células de la ZG están dispuestas en forma de racimos, de ahí que ésta zona se llame glomerulosa (del latín *glomerulus*: mora). Las células de la ZF se agrupan formando largos cordones celulares y es por ello que esta zona se llama fasciculada (del latín *fasciculus*: haz). Las células de la ZR

presentan una distribución espacial que asemeja una red. El nombre de esta zona proviene del latín *reticularis*, que significa red (Fox 2008; Figura 1).

La corteza suprarrenal aunque recibe inervación es principalmente estimulada por hormonas. La corteza está dividida en tres estratos celulares o capas. Su capa más externa o ZG constituye el 15 % del total de la glándula y produce la hormona aldosterona la cual es importantemente regulada por el sistema renina-angiotensina. También es regulada por la concentración de Na⁺ y K⁺ extracelular. La capa media o ZF, constituye el 50 % y produce glucocorticoides y es regulada principalmente por la hormona adrenocorticotropina (ACTH). La capa interna o ZR, constituye el 7 % y es productora de andrógenos sexuales. Por su parte la médula constituye alrededor del 28 % de la glándula. Las células cromafines de la médula adrenal están inervadas directamente por los nervios espláncnicos de la sustancia gris de la médula espinal. Los nervios simpáticos penetran a través del tejido conjuntivo de la corteza de la glándula suprarrenal y hacen sinapsis directamente con las células de la médula suprarrenal (Pocock y Richards, 2002).

Las glándulas reciben una importante irrigación de las arterias suprarrenales, que son ramas de las arterias diafragmáticas inferiores y de las arterias renales. Las venas suprarrenales drenan en la vena renal y a la vena cava inferior. El drenaje linfático se dirige a los ganglios linfáticos para-aórticos (Debuse 2004).

Las células de la corteza suprarrenal se diferencian de las células de la médula, porque suelen permitir la visualización de más de un núcleo y en su citoplasma se observa un gran número de cuerpos lipídicos que almacenan colesterol, que es el precursor de las diferentes hormonas lipofílicas que se producen en la corteza (Debuse 2004, Figura 1).

Las células cromafines de la médula en contraste contienen un gran número de vesículas o gránulos citoplasmáticos que almacenan catecolaminas que son hormonas peptidérgicas hidrofílicas y no liposolubles (Figura 1). Los gránulos citoplasmáticos de las células cromafines se tiñen específicamente de un color

marrón amarillento cuando son fijadas con soluciones que contienen sales de cromo. Esta reacción cromafín o feocrómica se debe a la oxidación y polimerización de las catecolaminas en el interior de éstos gránulos (Debuse 2004).

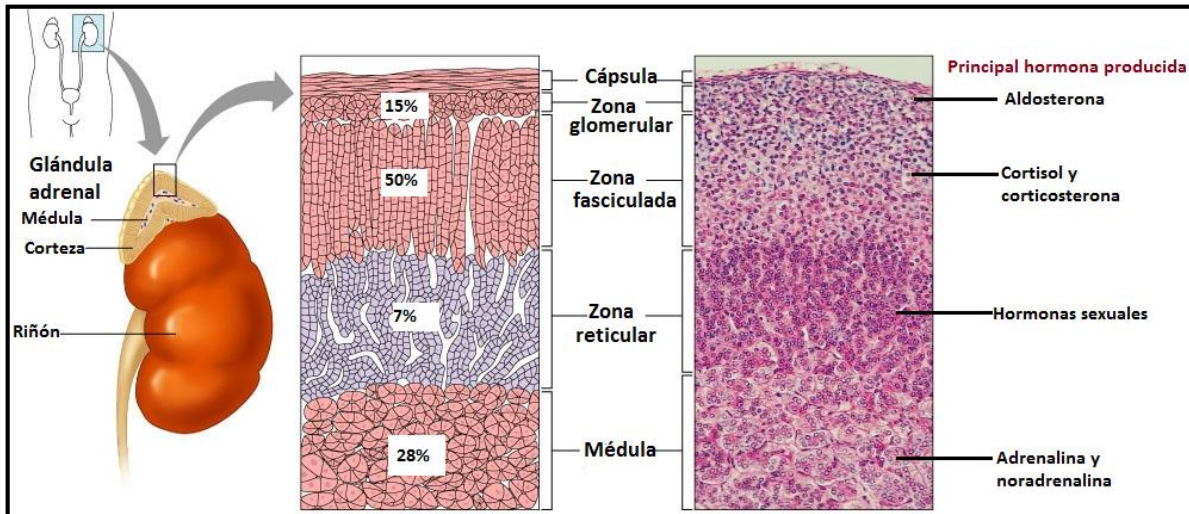


Figura 1. Esquema de la glándula suprarrenal. Muestra la ubicación de la glándula, las regiones morfo-funcionales (corteza y médula) y zonas que constituyen la corteza. La médula constituye el 28 % de la glándula. Modificado de Fox 2008.

3.3. Secreción de hormonas esteroideas en la corteza suprarrenal.

La corteza suprarrenal secreta hormonas esteroideas (Figura 2). Todas proceden del mismo precursor que es el colesterol. Los tres principales grupos de hormonas producidas son:

- 1) Mineralocorticoides. La aldosterona, que se produce en la capa granular o más externa, es el mineralocorticoide más potente. Los mineralocorticoides estimulan a los riñones para que retengan Na^+ y agua, al tiempo que incrementan la eliminación de K^+ en la orina. Estas acciones son útiles para aumentar el volumen y la presión sanguíneos y para regular el equilibrio electrolítico en la sangre (Ganong 2006).

- 2) Los glucocorticoides se producen en la capa media o fasciculada. En el humano el principal glucocorticoide es el cortisol (hidrocortisona). La secreción de cortisol es regulada por el eje hipotálamo hipófisis a través de la hormona ACTH secretada por la hipófisis anterior. El cortisol y otros glucocorticoides favorecen la disponibilidad de los nutrientes. Para esto ejercen numerosas acciones sobre el metabolismo; estimulan la gluconeogénesis (producción de glucosa a partir de aminoácidos y ácido láctico) e inhiben la utilización de la glucosa, lo que es útil para incrementar el nivel de glucosa en sangre; además estimulan la lipólisis (degradación de las grasas) con la liberación consiguiente de ácidos grasos libres hacia la sangre (Ganong 2006).
- 3) Las hormonas sexuales, son producidas en la capa interna o reticular. Su principal producto hormonal es la androsterona. La diferente producción de hormonas de la corteza suprarrenal depende de que en sus diferentes capas se producen en forma diferencial grupos de enzimas que permiten que los productos finales sean diferentes (Ganong 2006).

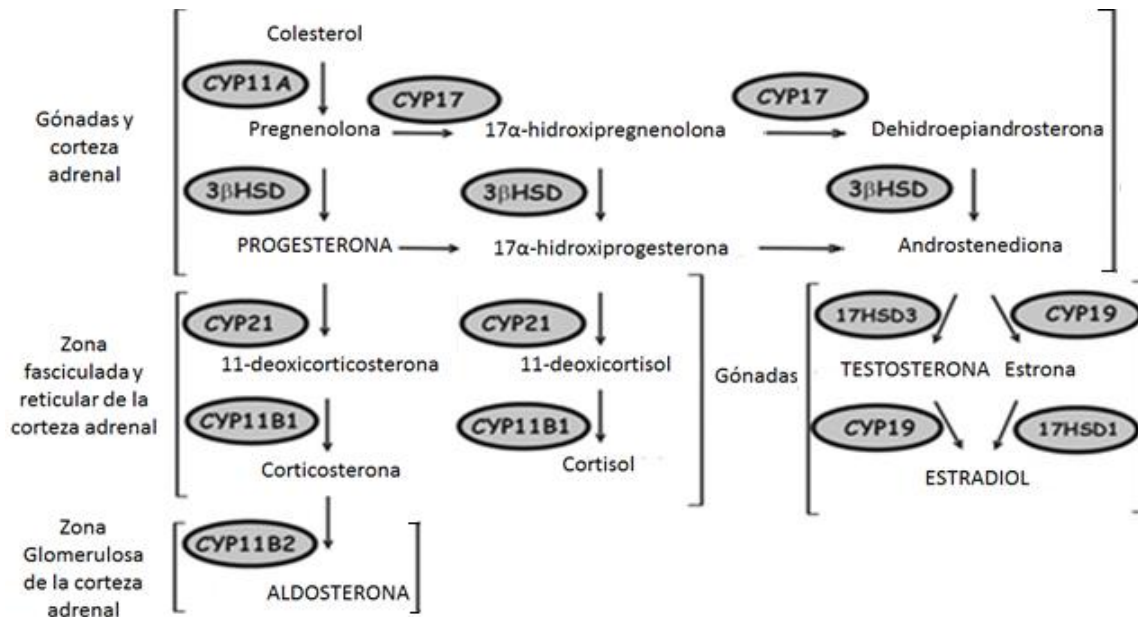


Figura 2. Biosíntesis de las hormonas de la corteza suprarrenal y enzimas involucradas (Payne y Hales, 2004).

3.4. Producción de hormonas y otros transmisores químicos en las células cromafines de la médula suprarrenal.

Las células de la médula son consideradas como células neuroendocrinas ya que secretan catecolaminas principalmente adrenalina (A) y noradrenalina (NA) también conocidas como epinefrina y norepinefrina así como dopamina en menores cantidades. Aproximadamente el 80 % de las catecolaminas liberadas por la médula es A, y el 16 % es NA. Cabe destacar que en la médula también se producen diversos péptidos opioides como: met-enkefalina y leu-enkefalina, así también las vesículas secretorias contienen ATP, cromograninas y neuropéptido Y (Ganong 2006).

La acetilcolina (Ach) que liberan las neuronas pre-ganglionares simpáticas activa a las células cromafines para que sinteticen y secreten catecolaminas por exocitosis al torrente sanguíneo.

También las células cromafines tienen otras propiedades fisiológicas semejantes a las neuronas post-ganglionares simpáticas, entre las que se incluye la capacidad de generar potenciales de acción tanto por actividad espontánea o secundariamente a la estimulación por Ach, lo cual es determinante para la secreción de éstas hormonas (Pocock y Richards, 2002).

3.4.1. Biosíntesis de catecolaminas.

Las catecolaminas son sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina. La figura 3 muestra que el primer paso en la síntesis de catecolaminas es catalizado por la enzima tirosina hidroxilasa que es el paso limitante en la ruta biosintética. Esta permite la síntesis de la dihidroxifenilalanina (DOPA). Posteriormente por la acción de la enzima dopamina descarboxilasa se sintetiza la dopamina. El paso de dopamina a NA lo cataliza la enzima dopamina β -hidroxilasa, y en el último paso, la transformación de NA a A es llevada a cabo por la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT). Las catecolaminas son acumuladas dentro de vesículas por el transportador de monoaminas que utiliza el gradiente de H^+ generado por una bomba H^+ -ATPasa. Por esta razón el pH de las vesículas es ácido con un valor aproximado de 5.5. Existen dos tipos de transportadores, llamados VMAT1 y VMAT2 (por Vesicular Monoamine Transporter) y las cromafines expresan ambos (Erickson et al., 1996).

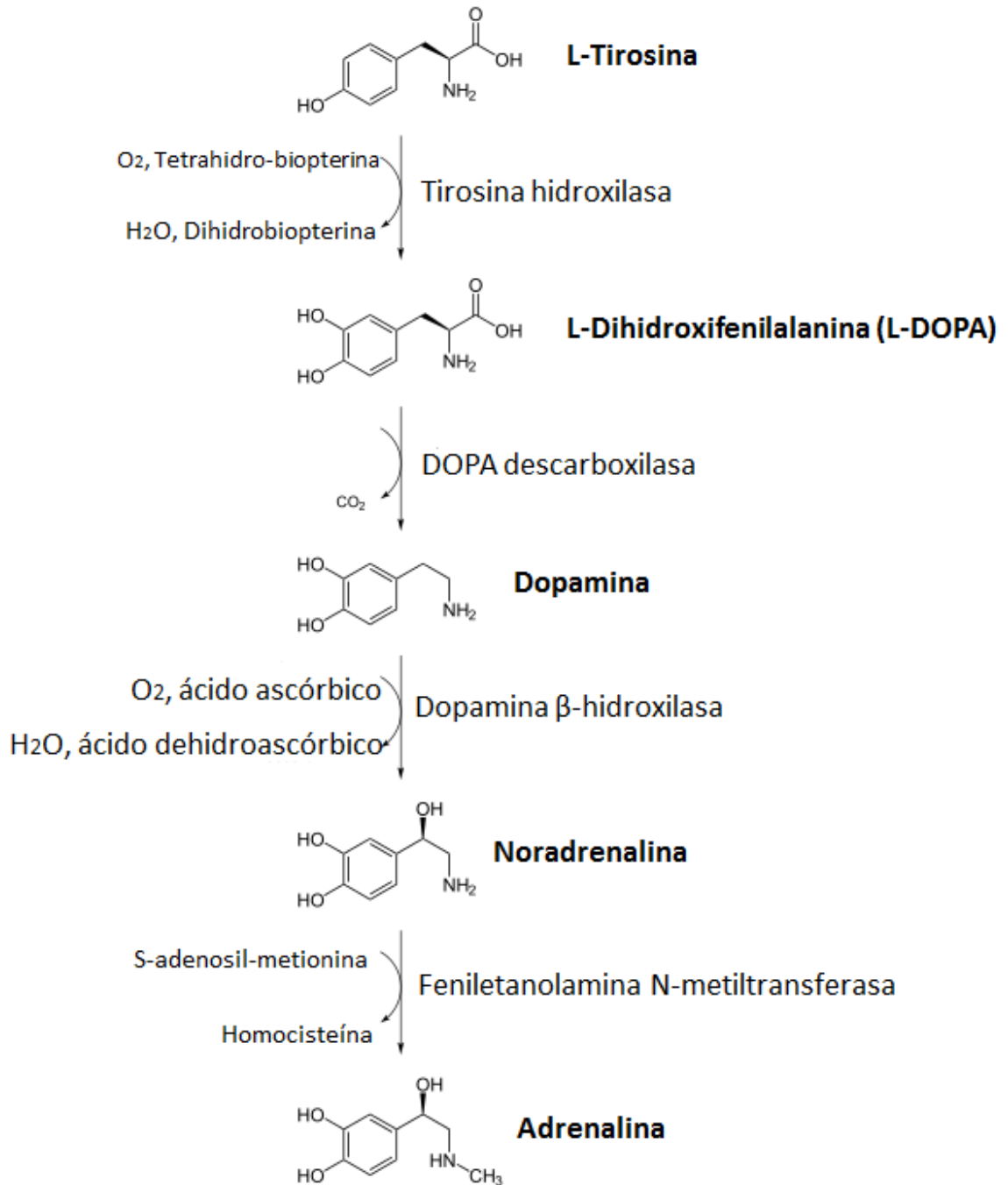


Figura 3. Biosíntesis de las catecolaminas en la médula suprarrenal y enzimas involucradas. Modificado de Fox 2008.

3.4.2. Secreción de Catecolaminas.

La secreción de catecolaminas permite preparar al organismo para afrontar el estrés permitiendo así la respuesta de lucha o huida. Son diversas las situaciones estresantes que conllevan a la liberación de catecolaminas como por ejemplo: el ejercicio, la hipoglucemia, el frío, las hemorragias, aunque la secreción también puede darse como respuesta a reacciones emocionales como el miedo, el dolor y la excitación sexual (Pocock y Richards, 2002).

La Ach es el neurotransmisor pre-sináptico principal liberado del nervio esplácnico. La Ach se une a su receptor nicotínico (nAChR) en la célula cromafín. La Ach activa receptores nicotínicos y muscarínicos. Los receptores nicotínicos son inotrópicos, es decir, cuando se activan abren canales sensibles a cationes que despolarizan la membrana y al hacerlo activan los canales de Na^+ sensibles a voltaje. El incremento del influjo de Na^+ despolariza más a las células con lo cual también se incrementa la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Lo anterior genera un potencial de acción cuya repolarización se produce por la apertura de canales de K^+ dependientes de voltaje. El influjo de Ca^{2+} durante los potenciales de acción incrementa la concentración de calcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ante un cambio determinado en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ las vesículas secretorias adquieren la capacidad de fusionarse a la membrana. El proceso de liberación incluye la participación del complejo SNARE (por soluble, N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptors) que es el complejo proteico involucrado en la fusión de la membrana vesicular y la membrana plasmática. La fusión vesicular ocurrirá solamente con alta probabilidad cuando el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ supere cierto valor umbral. La proteína sinaptotagmina monitorea el Ca^{2+} , con lo cual se produce una modificación conformacional del complejo SNARE resultando en la fusión de las membranas. La finalización de este proceso conduce a la liberación del contenido vesicular a la circulación sanguínea por parte de las células cromafines (Acuna et al., 2014).

3.4.3. Efectos fisiológicos de las catecolaminas.

La A y NA a dosis fisiológicas tienen algunos efectos similares y otros antagonistas. Los cambios fisiológicos inducidos por las catecolaminas están mediados por su interacción con receptores específicos, denominados receptores adrenérgicos, que se localizan en la superficie de las células efectoras. Los efectos de las catecolaminas en diversos tejidos se llevan a cabo en segundos, en contraste con los minutos, horas o días que caracterizan a las acciones producidas por las hormonas de la corteza.

Se conocen dos tipos de receptores adrenérgicos principales, los receptores α y los β , que a su vez tienen variantes. Estos receptores son heptahelicales y su ocupación activa a proteínas G triméricas (de subunidades α , β y γ). La A tiene una acción más potente sobre los receptores β que sobre los receptores α . Mientras que la NA es más eficaz en la activación de los receptores α , que los receptores β . Tanto los α como los β tienen los subtipos 1 y 2. Estos subtipos se expresan en los diferentes tejidos en los cuales la A como la NA tienen sus acciones (Ver tabla 1). Los segundos mensajeros que estos receptores movilizan pueden clasificarse en dos grupos generales. En esencia los receptores tipo alfa activan a proteínas Gq con lo cual se activa la fosfolipasa "C" y la cinasa "C", así como inducen la liberación de Inositol trifosfato (IP_3) y consecuentemente liberan Ca^{2+} de pozas intracelulares, mientras que los de tipo β activan (a través de proteínas Gs) o inhiben (a través de proteínas Gi) a la proteíncinasa "A" (PKA) que genera fosforilaciones de diversas proteínas señalizadoras (Ganong 2006).

Tanto la A como la NA aumentan la presión arterial sistólica estimulando la frecuencia cardíaca y la contractilidad, y por tanto, aumentan el gasto cardíaco. Algunos de los efectos metabólicos producidos por la adrenalina son: a) favorece la disponibilidad de nutrimentos al estimular la degradación de glucógeno en el hígado (glucogenólisis) b) aumento de la lipólisis c) inhibición neta de la secreción de insulina. d) aumenta el metabolismo porque estimula el consumo de oxígeno al

favorecer la formación de mitocondrias y enzimas respiratorias, y e) favorece la fuerza de contracción cardíaca. La NA también es un potente estimulador de la lipólisis. Lo anterior, permite el mantenimiento de sustratos nutritivos durante las reacciones de estrés, como la hipoglucemia o enfrentamiento o huida. Las catecolaminas también causan contracción de la musculatura lisa de otros tejidos, como el de las pupilas induciendo su dilatación, o el de los vellos induciendo la piloerección. La respuesta de determinado tejido frente a la A o hacia la NA circundante, dependerá de las proporciones relativas de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos que expresen (Fox 2008).

Órgano	Efectos adrenérgicos del sistema simpático-suprarrenal	Receptor adrenérgico
Ojo	La contracción de las fibras radiales del iris dilata la pupila	α_1
Corazón	Aumento de la frecuencia cardíaca y de la fuerza de contracción	Principalmente β_1
Piel y vasos viscerales	Constricción arteriolar con contracción del músculo liso	α_1
Vasos del músculo esquelético	Constricción arteriolar por constricción del nervio simpático Las arteriolas se dilatan debido a la hormona adrenalina	α_1 β_2
Pulmones	Dilatación de los bronquiolos (vías respiratorias) por relajación del músculo liso	β_2
Estómago e intestino	La contracción de los esfínteres retrasa el paso de alimento	α_1
Hígado	Glucogenólisis y secreción de glucosa	α_1, β_2

Tabla 1. Receptores adrenérgicos expresados en algunos tejidos. Tomado de Kronenberg 2009.

3.5. Desarrollo fetal de la glándula suprarrenal.

La formación de la corteza externa y una médula interna se genera durante la etapa temprana de la vida embrionaria.

3.5.1. Corteza fetal.

Las células progenitoras (células adrenogonadales) que dan origen a la corteza suprarrenal provienen del epitelio celómico situadas en el mesenterio dorsal. Éstas migran a partir del día 9 dpc a la cresta urogenital. Los precursores corticales suprarrenales se separan de los precursores gonadales al 10.5 dpc y terminan por acumularse en el extremo craneano del mesonefro al 11 dpc, donde se condensan para formar la primera manifestación reconocible de la corteza suprarrenal. La corteza es encapsulada por tejido conjuntivo en el día 14 dpc en el ratón (Hammer et al., 2005).

En el humano la migración de las células precursoras de la cabeza del feto comienza alrededor de la cuarta semana de gestación (SG). Para el segundo mes o la octava SG, el feto ya adquirió una corteza suprarrenal rudimentaria (Hammer et al., 2005). En los humanos la corteza suprarrenal fetal está compuesta de dos zonas distintas; una zona fetal y una zona definitiva. La zona fetal representa la mayor parte (del 80 % al 90 %) de la corteza, y es el sitio primario de la esteroidogénesis. La zona definitiva ocupa del resto de la corteza y comprende una banda estrecha de células que rodean a la zona fetal. No obstante, a través de estudios ultraestructurales, se ha demostrado que existe una tercera zona entre la zona fetal y la definitiva, cuyas células tienen características intermedias y se ha denominado zona transicional (ZT). Alrededor de la 30 SG, la zona definitiva y la zona transicional comienzan a adoptar el aspecto de la ZG y de la ZF respectivamente (Mesiano y Jaffe, 1997). Existe la idea de que la zona fetal degenera por apoptosis alrededor del primer mes de vida postnatal (Kiiveri et al., 2002), no obstante otros autores piensan que la ZR es un remanente de la zona fetal (Chamoux et al., 2005). Sin embargo, no hay indicio alguno de insuficiencia

cortical suprarrenal durante el periodo perinatal y el proceso de remodelación postnatal, por lo que es probable que las zonas corticales que presenta un individuo adulto, estén ya presentes y sean funcionales antes del nacimiento. De hecho, estudios morfológicos han identificado una especie de ZG y ZF en etapas tardías de la gestación del humano (Yen et al., 2001).

En contraste con la glándula suprarrenal fetal de los humanos, en la glándula suprarrenal fetal del ratón no se ha descrito la presencia de una zona fetal. Diversos estudios sólo se remiten a describir la presencia de la corteza.

3.5.2. Médula fetal.

En cuanto a la médula, ésta deriva del ectodermo de la cresta neural (Hammer et al., 2005). Se ha propuesto que las neuronas simpáticas y células cromafines se derivan de un linaje celular común llamado simpático-adrenal, que se desarrolla de células de cresta neural localizadas en la vecindad de la aorta dorsal. En respuesta al ambiente local estas células adquieren propiedades neuronales y catecolaminérgicas. Posteriormente las células simpático-adrenales migran hacia los ganglios simpáticos al primordio de la corteza adrenal. En éste último se localizan hacia su centro y se diferencian en células cromafines (Huber 2006). En el ratón la migración de las células de la cresta neural comienza alrededor del 12 dpc y para el 13 dpc las células que darán origen a la médula suprarrenal ya se localizan en la parte central de la corteza suprarrenal (Hammer et al., 2005). En el humano la migración de las células simpaticoadrenales se presenta alrededor de la novena SG (Hammer et al., 2005).

3.6. Producción y efectos de hormonas esteroideogénicas y catecolamínicas de la glándula suprarrenal fetal y perinatal.

Durante la vida fetal las glándulas suprarrenales desempeñan funciones importantes; regulan la homeostasis intrauterina, su intervención en el desarrollo de muchos sistemas orgánicos fetales es clave, como por ejemplo los pulmones (ver adelante), preparando de esta manera al organismo para la vida extrauterina, y también son reguladoras del inicio del parto (Kiiveri et al., 2002).

3.6.1. Hormonas esteroideogénicas.

La zona fetal produce los precursores necesarios para la síntesis de estrógenos placentarios. El principal esteroide secretado por la zona fetal es la dehidroepiandrosterona sulfatada (DHEA-S), el cuál es un precursor en la síntesis de estrógenos en la placenta (Fox 2008). En el humano, la esteroideogénesis suprarrenal fetal inicia de la sexta y octava SG, cuando las células del primordio suprarrenal se diferencian y adquieren características esteroideogénicas. Los estrógenos, sobre todo el estriol, en la circulación materna son indicadores de la actividad esteroideogénica suprarrenal fetal. La placenta que constituye la fuente principal de estrógenos durante el embarazo, utiliza andrógenos exógenos aportados en mayor grado por la corteza suprarrenal fetal y en menor grado por la corteza suprarrenal materna. A la 8 SG, pueden detectarse concentraciones bajas de estriol en la circulación materna que resultan en la producción de DHEA-S en el feto. Alrededor de las 12 SG, las concentraciones de estriol aumentan con rapidez alrededor de 100 veces. Este aumento coincide con el inicio del crecimiento de la zona fetal. La producción de DHEA-S durante el segundo y tercer trimestre aumenta de manera considerable. Al término de la gestación la glándula suprarrenal fetal produce unos 200 mg/día de DHEA-S (Yen et al., 2001). Después de la mitad del periodo de gestación (22 SG), las células de la ZT tienen enzimas que les permiten sintetizar cortisol y, por lo tanto pueden ser análogas a las de la zona fasciculada de la glándula suprarrenal de un adulto (Mesiano y jaffe, 1997).

3.6.2. Cortisol fetal.

El cortisol fetal desempeña varias funciones: 1) aumenta la síntesis de surfactante (sustancia compuesta principalmente por fosfolípidos y que evita el colapso alveolar durante la espiración) por parte de las células pulmonares alveolares de tipo II, 2) acelera la diferenciación funcional del hígado, 3) induce enzimas relacionadas con la síntesis de glucógeno hepático entre las cuales se encuentran: la tirosina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, arginina sintetasa y fosfoenolpiruvatocarboxilasa 4) también puede estimular la maduración de las células β del páncreas, 5) aumenta la actividad adrenomedular de fenilacetiltransferasa (PNMT), que, a su vez aumenta la metilación de NA a A (Kronenberg 2009).

En las glándulas suprarrenales de fetos humanos de 18 a 21 SG la vía metabólica de los mineralocorticoides está localizada en la zona definitiva, aunque su actividad es baja (Yen et al., 2001). Cerca del nacimiento, la síntesis de mineralocorticoides como aldosterona es más importante, ya que se necesitan para el enfrentamiento a la vida extrauterina (Chamoux et al., 2005).

Se sabe que la sensibilidad de la glándula suprarrenal a la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) aumenta durante el segundo y tercer trimestre del feto. Las acciones de la ACTH están mediadas por su interacción con receptores específicos heptahelicales sobre la superficie de la corteza suprarrenal (Yen et al., 2001).

Por lo que respecta a la esteroidogénesis suprarrenal del ratón, se sabe que la enzima desmolasa de colesterol, que lleva a cabo la conversión de colesterol a pregnenolona, se expresa al 11 dpc en el primordio suprarrenal. La enzima CYP17 que lleva a cabo la conversión de pregnenolona y progesterona a 17α -hidroxipregnenolona y 17α -hidroxiprogesterona respectivamente se expresa en las células suprarrenales fetales entre el 12.5 y 14.5 dpc en el ratón (Payne y Hales, 2004).

3.6.3. Catecolaminas fetales.

Se tiene registro de que en el tejido medular fetal de humano y oveja se expresa la enzima PNMT que es la enzima que lleva a cabo la conversión de NA a A (Cohen et al., 1984). También se sabe que la NA y A están presentes en la médula adrenal y en la circulación fetal antes del nacimiento (Cohen et al., 1984). Así mismo, por estudios de HPLC se ha encontrado que la médula adrenal es la principal fuente de A y NA circulantes durante una hipoxemia aguda fetal; en particular en estos estudios se registró un aumento en la A y NA conforme se disminuía la presión parcial de oxígeno a intervalos de 10 minutos, con lo cual se simula diferentes grados de hipoxia aguda en fetos de oveja entre la edad de 124 a 129 días de gestación (Cohen et al., 1984). Lo anterior es evidencia de que las células cromafines monitorean los niveles de oxígeno y que éstas últimas regulan la producción de catecolaminas durante el periodo fetal a término.

También se ha reportado un incremento del transcrito de la PNMT durante el desarrollo fetal de la oveja (Adams et., 1998). Más aún, dado que el cortisol aumenta en la rata durante la etapa fetal se sabe que este regula a la alza el transcrito de la enzima PNMT, regulación que en el adulto ocurre (Wong et al., 2006).

Durante el parto se desencadena una respuesta adrenérgica inducida por el estrés hipóxico en el feto y en el recién nacido. En grupos de niños después del parto se han determinado en la sangre del cordón umbilical concentraciones de NA de 15 nmol/L (2.500 pg/mL) y adrenalina de 2 nmol/L (370 pg/mL). En contraste, en niños prematuros, se ha detectado que estos valores aumentan, siendo para la NA de 25 nmol (4.200 pg/mL) y para la adrenalina de 35 nmol/L (640 pg/mL) (Kronenberg 2009). Aunque la glándula suprarrenal libera más A que NA, las concentraciones plasmáticas de NA exceden los niveles de A debido a que esta última es liberada tanto a nivel periférico, adrenomedular y para-aórtico. Estos cambios hormonales inducen diversas adaptaciones para la maduración del feto requeridas a su nacimiento como: a) cardiovasculares, que incluyen el aumento de la presión sanguínea y de los efectos inotrópicos cardíacos, b) aumento de la secreción de glucagón y disminución de la secreción de insulina, así como el aumento de las

concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres que favorecen la nutrición del feto y c) la movilización del líquido pulmonar y el aumento de la liberación de surfactante que es determinante para la maduración pulmonar (Kronenberg 2009).

3.7. Mecanismos celulares que incrementan la producción de catecolaminas perinatales inducida por la hipoxia.

Se sabe que los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ son críticos para la secreción de catecolaminas inducida por la hipoxia que ocurre durante el parto.

Se ha encontrado que la hipoxia aguda estimula la liberación de catecolaminas en las células cromafines de hembras y neonatos de rata a través de la inhibición de la actividad de los canales de K^+ . En estudios de fijación de voltaje, las corrientes de potasio se muestran disminuidas por la hipoxia, lo que sugiere que el cierre de las canales de potasio resulta en la despolarización y consecuente activación de los canales de calcio sensibles a voltaje (Mochizuki-Oda et al., 1997). La inhibición hipóxica de los canales de K^+ inician la despolarización del potencial de reposo de las células cromafines hasta un valor umbral al cual se activan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (~ -50 a -40 mV) principalmente los tipo T y L. Al activarse estos canales se incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ y consecuentemente la secreción de catecolaminas. También en experimentos de Outside Out Patch se demostró que la probabilidad de apertura de los canales de potasio dependientes de voltaje disminuye por hipoxia. Al parecer el canal de potasio en la célula cromafín es sensible al oxígeno, pero el mecanismo no ha sido elucidado (Seidler y Slotkin, 1985).

En el caso de hipoxia intermitente (IH, 15 s a 10% de O_2 , seguido por 5 min a 21% de O_2 , 8 h por día por 5 días), ha sido bien establecido que los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) también son modificados incrementándose. La IH en neonatos de rata de 0-5 días de edad aumenta las corrientes de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de catecolaminas; antioxidantes (como pentacloruro de manganeso (III) tetrakis(1-metil-4-piridil) porfirina (MnTMPyR), compuesto que es permeable a la

membrana y actúa como superóxido dismutasa; Apocinina, inhibidor de NOX) impiden la anterior respuesta a hipoxia lo que sugiere la implicación de señalización por ROS. Esto indica que ROS participa en forma crítica en la respuesta secretora de las células cromafines durante la hipoxia. En la IH se regula a la alza los niveles de mRNA de NADPH oxidasa 2 y 4 (NOX2, NOX4), aumenta la actividad de NOX (generador de especies reactivas de oxígeno), aumenta el mRNA de los canales de Ca^{2+} tipo T Cav3.1 y Cav3.2, aumenta la corriente de Ca^{2+} a través del canal tipo T y también aumenta el mRNA de los receptores de rianodina (RyRs) 2 y 4 (Souvannakitti et al., 2010). La activación de los RyRs por ROS induce el eflujo de calcio del retículo endoplásmico al citosol, contribuyendo así también a amplificar la señal de Ca^{2+} en las células cromafines (Murayama et al., 1999; Figura 4).

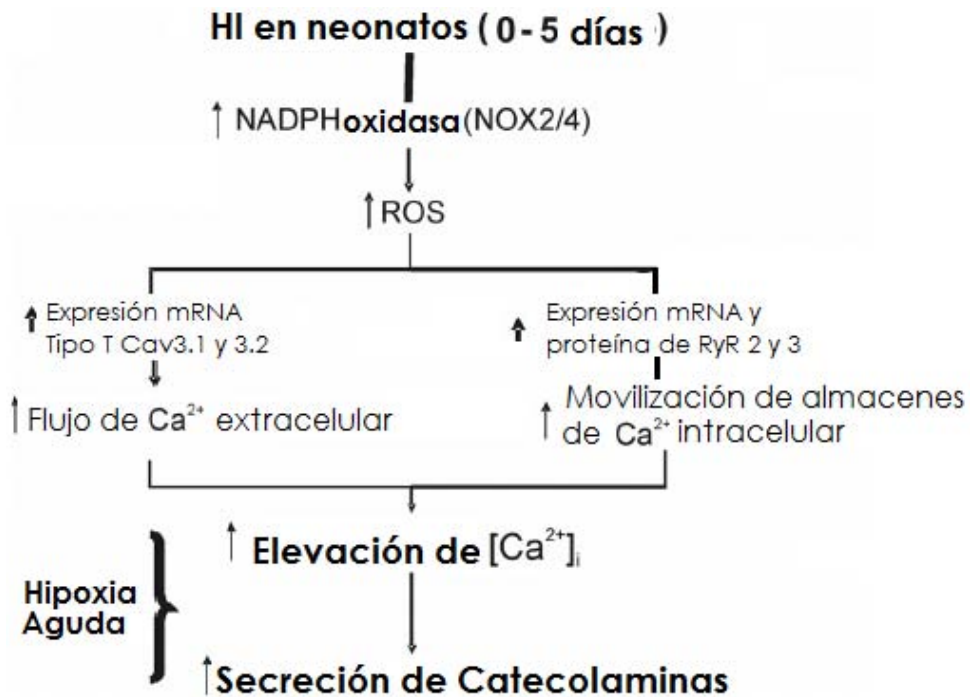


Figura 4. Presentación esquemática de las vías de señalización durante los efectos de la hipoxia intermitente (HI) en la secreción de catecolaminas en las células cromafines de ratas neonatas (Souvannakitti et al., 2010).

3.8. Uniones comunicantes.

3.8.1. Estructura y composición.

Las uniones comunicantes (UC) son estructuras proteicas especializadas de la membrana, que se encuentran formando conglomerados de canales intercelulares. Los canales intercelulares permiten que haya comunicación directa de iones y segundos mensajeros entre dos células adyacentes. Las UC fueron observadas por primera vez a través de microscopía electrónica y se observó que en estas regiones el espacio que separa a ambas células es de 2-4 nm. Este espacio es un orden de magnitud menor al observado en otras regiones de la membrana entre células adyacentes. Los modelos tridimensionales de éstas estructuras se han elucidado a

partir de preparaciones de membranas enriquecidas en UC por métodos bioquímicos, a través de estudios de difracción de rayos X y de electrones (Goodenough y Stoeckenius, 1972).

Estos canales intercelulares están formados por un par de conexones o hemicanales. Cada uno de estos conexones es proporcionado por una de las dos células. Cada conexón está formado de 6 proteínas transmembranales formadas por proteínas homólogas llamadas conexinas (Cxs). Estos conexones establecen contacto en el espacio que separa a las dos membranas celulares ensamblando un canal intercelular entre el citoplasma de ambas células (Figura 5).

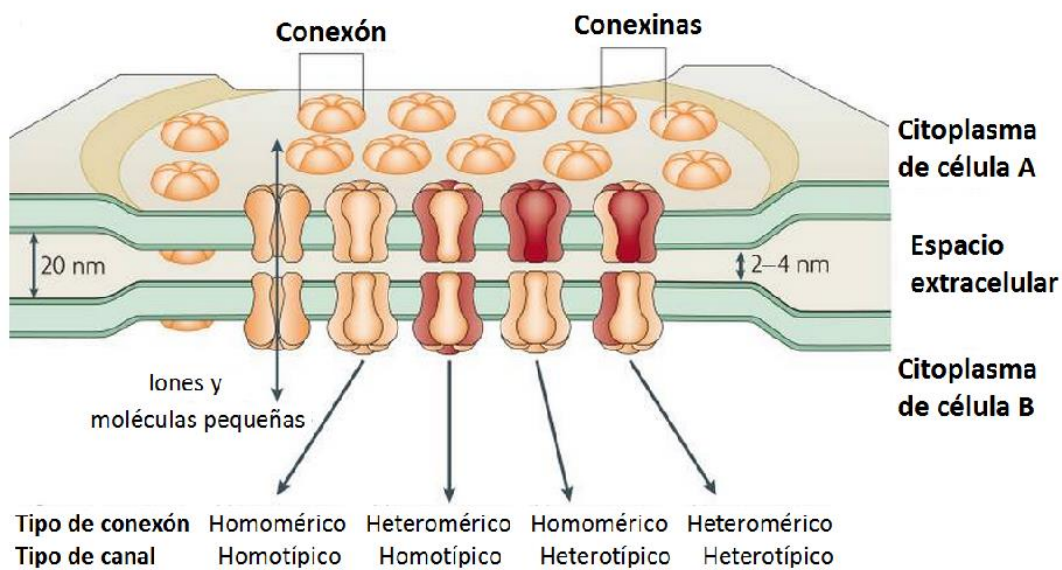


Figura 5. Estructura de los canales de unión comunicante (Bloomfield y Völgyi, 2005).

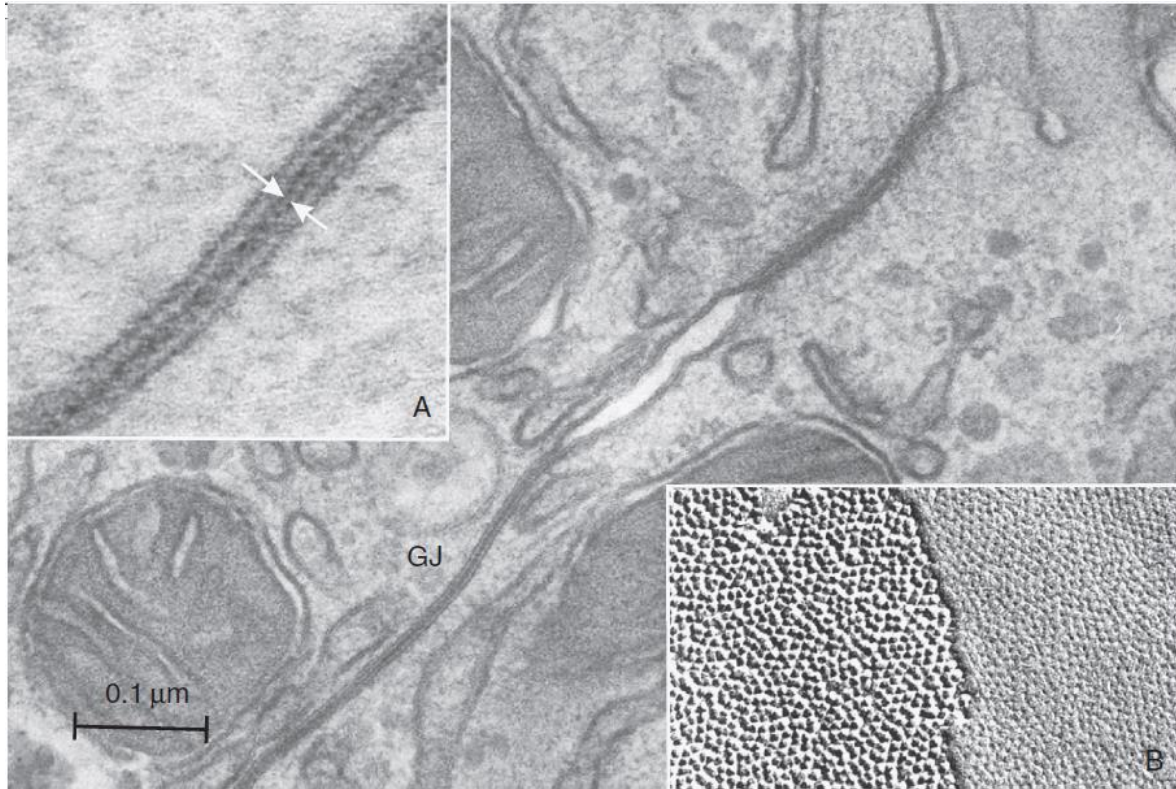


Figura 6. Microscopía electrónica de placa de unión comunicante (GJ) en hepatocitos de ratón. A) Imagen ampliada que revela la “brecha” de 2-4 nm (flechas blancas) que hay entre membranas plasmáticas de dos células adyacentes conectadas por uniones comunicantes. B) Crio fractura de placa de unión comunicante (Goodenough y Paul, 2009).

Cada Cx de las doce que incluyen un canal intercelular está constituida por cuatro dominios transmembranales, dos dominios extracelulares y tres dominios intracelulares (Figura 7). Los cuatro dominios transmembranales (M1, M2, M3 y M4) son hidrófobos y atraviesan completamente el espesor de la membrana. De estos, el dominio menos hidrofóbico es el M3, por lo que se cree que este forma el poro del canal. Los dominios extracelulares (E1 y E2) son regiones hidrofílicas que participan en el reconocimiento de las conexinas que formarán el conexón de las células adyacentes. Los dominios intracelulares citoplasmáticos están constituidos por un amino terminal (NH₂), una asa intracelular (CL) que une el segundo con el tercer segmento transmembranal y una región carboxilo terminal (COOH⁻). Las dos

últimas, son las regiones que más varían entre las diversas Cxs. La diversidad molecular que presentan estos segmentos está implicada en la regulación específica de la actividad funcional de los diferentes tipos de canales intracelulares (Nicholson et al., 2003; De Maio et al., 2002).

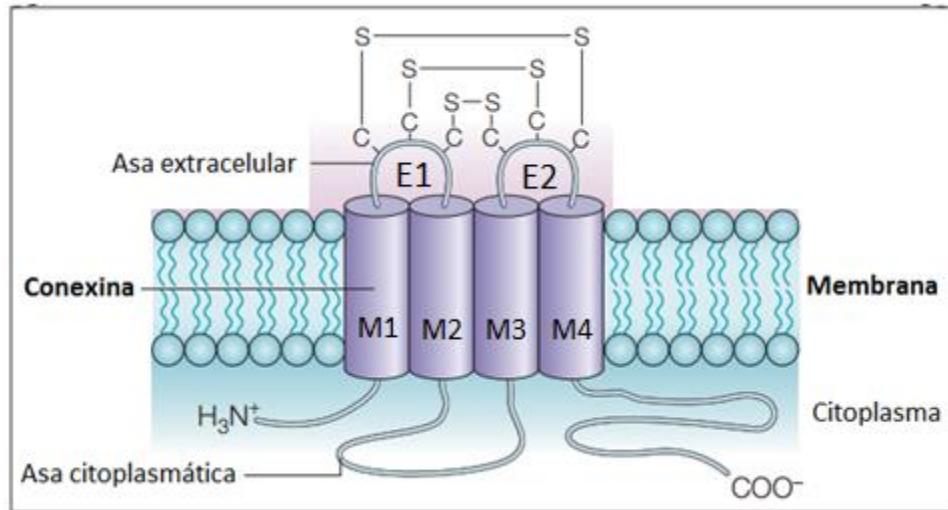


Figura 7: Esquema que muestra los dominios intracelulares, transmembranales y extracelulares que tienen todas las conexinas (Söhl et al., 2005).

Las conexinas están codificadas por una familia de genes que comprende 20 miembros en el genoma humano y 23 en el genoma del ratón. Para nombrar a cada una de las Cxs identificadas se utiliza el prefijo Cx seguido de un número que indica el peso molecular teórico aproximado en kilodaltones (kDa) para cada Cx (Oyamada et al., 2005).

A través de la implementación de técnicas moleculares se han logrado aislar y clonar varias Cxs. Las Cxs se clasifican en tres clases o grupos: α , β y γ (Tabla 2). Estos grupos están conformados con base en la homología de las secuencias de aminoácidos de las distintas Cxs. Las características fisicoquímicas entre las Cxs de los grupos α , β y γ difieren, mientras que las características fisicoquímicas dentro de cada grupo se conservan (Segretain y Falk, 2004; Evans y Martin, 2002; Nicholson 2003).

Conexinas del grupo α		Conexinas del grupo β	
mCx30.2	hCx31.9	mCx26	hCx25
mCx33	hCx37	mCx30	hCx26
mCx37	hCx40	mCx30.3	hCx30
mCx40	hCx43	mCx31	hCx30.3
mCx43	hCx46	mCx31.1	hCx31
mCx46	hCx50	mCx32	hCx31.1
mCx50	hCx62		hCx32
mCx57	hCx59		
Conexinas del grupo γ		Conexinas no agrupadas	
mCx45	hCx45	mCx23	hCx23
mCx47	hCx47	mCx29	hCx30.2
		mCx36	hCx36
		mCx39	hCx40.1

Tabla 2. Muestra las distintas Cxs expresadas en el humano (hCx) y en ratón (mCx), y como se han clasificado en grupos (α , β y γ) (Modificado de Nicholson et al., 2003).

Dado que una sola célula generalmente expresa más de una Cx, puede haber los siguientes canales intercelulares: canal intercelular homotípico, cuando cada conexón que constituye a las UC está formado por un solo tipo de Cxs (Conexón homomérico); canal intercelular heterotípico, cuando cada conexón de la UC está conformado por conexones homoméricos, pero cada uno de ellos formados por diferentes conexinas; Canal intercelular heteromérico, cuando ambos conexones de la UC están formados por mezclas de conexinas (Oyamada et al., 2005; White y Paul, 1999). Se sabe que las cisteínas de las asas extracelulares determinan la interacción entre conexones formados por diferentes conexinas. Por ejemplo se ha demostrado que la Cx43 forma canales heteroméricos con Cx37, Cx40 y Cx46 (todos del tipo α), pero no con Cx32 (tipo β). La Cx46 forma canales heteroméricos con Cx50 (ambos del tipo α), mientras que la Cx32 con Cx26 (ambos del tipo α) también forma canales heteroméricos (Segretain y Falk, 2004).

3.8.2. Funciones generales que llevan a cabo las uniones comunicantes.

Actualmente se sabe que las UC se encuentran expresadas propiamente en todos los tejidos animales, a excepción de los eritrocitos y las plaquetas. Las UC permiten el movimiento directo de moléculas de una célula a otra. Las sustancias que pueden ser intercambiadas a través de las UC incluyen iones y metabolitos intracelulares, como los nucleótidos, aminoácidos, oligosacáridos y segundos mensajeros. Dado que permiten el acoplamiento intercelular iónico, las UC proveen un mecanismo eficaz para propagar potenciales de acción, permitiendo que la comunicación intercelular sea casi instantánea; esto es mucho más rápida que la comunicación que ocurre a través de sinapsis químicas. También existen evidencias de que participan en la regulación del desarrollo embrionario, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis de tejidos, regulando aspectos de morfogénesis, diferenciación y proliferación celular (Oyamada et al., 2005).

En cuanto al estudio funcional de los canales que forman las UC, se sabe que éstos, al igual que otros canales de membrana, presentan cambios conformacionales que les permite pasar del estado abierto al estado cerrado, en el orden de milisegundos. También el que su estado de apertura o cierre puede ser modulado por cambios en el pH intracelular. Otro ejemplo es la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ la cual en concentraciones mayores a 1 μ M provocan el cierre del canal. También los cambios del voltaje (Vj) aplicado entre las células o potencial de transunión determinan el cierre del canal (Pérez et al., 1994).

Los canales intercelulares también se cierran en respuesta a factores asociados con el incremento de la división celular. Entre estos se encuentran factores de crecimiento como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y EGF (factor de crecimiento epidérmico). También su estado de apertura puede ser afectado por oncogenes tales como el oncogen aislado del virus del Sarcoma de Rous (v-Src), proteína cinasa "A" (PKA) y cinasas dependientes de ciclina 2 (Cdc2). Estos factores

inducen una fosforilación directa o indirecta del carboxilo terminal de los canales de UC (Nicholson 2003).

Las Cxs exhiben una vida media corta (2-3 horas), indicando que estas presentan una alta tasa de recambio en la membrana o que pueden expresarse transitoriamente, permitiendo también la regulación de la comunicación intercelular (Saez et al., 2003).

3.8.3. Patologías asociadas a conexinas.

La lista de las enfermedades causadas por defectos genéticos en distintas conexinas ha ido creciendo hasta implicar a once genes de los veintiuno que tiene el hombre (Pfenniger et al., 2011). La primera conexinopatía que se descubrió fue la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X, un tipo de neuropatía que afecta las fibras mielínicas motoras y sensoriales, causada por mutaciones en el gen de la Cx32 (Bergoffen et. al., 1993). Las conexinas no solo desempeñan un papel relevante para mantener la función de la mielina a nivel del nervio periférico, también son críticas en el mantenimiento de la mielina del sistema nervioso central. Las mutaciones recesivas en el gen de la Cx47 causan un cuadro de hipomielinización severa conocido como la enfermedad tipo Pelizaeus-Merbacher. La Cx47 se expresa fundamentalmente en los oligodendrocitos, las células de la glía que forman la mielina a nivel central. Sí esta vía de comunicación intercelular entre las células de la glía se interrumpe, como ocurre cuando no se forman los canales de Cx47, el potasio (K^+) y el agua se acumula en la región periaxonal generando bloqueo de la conducción eléctrica, edema y la destrucción de la mielina (Orthmann-Murphy et. al., 2007).

En los miocardiocitos del ventrículo solo se expresa la Cx43. En el modelo del ratón se sabe que la Cx43 desempeña un papel importante en el desarrollo embrionario del corazón y, en adulto, en la conducción del impulso cardíaco. El ratón deficiente en esta conexina muere al nacimiento por falla en el bombeo cardíaco. Sin embargo, en el hombre solo una de las más de sesenta mutaciones identificadas en el gen de

la Cx43 en pacientes con displasia oculo-dendro-digital cursa con taquicardias ventriculares recurrentes y bloqueo auriculoventricular (Paznekas et. al., 2009). La delección de Cx36 induce alteraciones en la secreción de las células beta pancreáticas e intolerancia a la glucosa (Pérez-Armendariz 2013). También se sabe que hay cambios de expresión de conexinas en células tumorales o en cáncer de diversos tejidos, así como el que la delección de conexinas específicas facilita el crecimiento tumoral inducido por carcinógenos (Yamasaki et al., 1995).

Se sabe que la expresión de UC es alterada en los procesos tumorales (Willenberg et al., 2006; Yamasaki et al., 1995). En el tejido medular adrenal, los tumores más frecuentes son los feocromocitomas. En la línea celular tumoral cromafín de rata, PC-12, la expresión de la Cx36 ha sido reportada (Lu et al., 2007). Con respecto a médula adrenal humana, mientras que la Cx50 es la conexina de mayor expresión en la médula normal los feocromocitomas también aparecen como inmunoreactivos para Cx26 (Willenberg et al., 2006). Esto sugiere que la adquisición de un fenotipo tumoral en la médula adrenal humana puede ser acompañada por un cambio en la expresión de conexinas. Aún más interesante, se ha encontrado que la expresión de Cx50 en feocromocitoma maligno humano es significativamente regulada a la baja en comparación con la médula normal y también comparada con la expresión en feocromocitoma benigno humano. En resumen, hay un cambio en el nivel de expresión o isoformas de conexinas durante la tumorigénesis en la médula adrenal, aunque falta demostrar que estos cambios contribuyan a la tumorigénesis y/o a la hipersecreción de catecolaminas (Colomer et al., 2009).

3.9. Uniones comunicantes en la glándula suprarrenal.

3.9.1. Expresión de conexinas en células cromafines del sujeto adulto.

Las células neuroendocrinas cromafines constituyen el tipo celular dominante en el tejido medular adrenal. Hasta ahora se han identificado tres conexinas que pueden acoplar células cromafines en médula suprarrenal en las especies de ratón, rata y humano. Las células cromafines de rata expresan el transcrito de la Cx36 y Cx43 en la misma célula cromafín (Martin et al., 2001). En contraste, en las células cromafines de ratón se expresa predominantemente la Cx36 (Degen et al., 2004). En la médula humana se ha descrito por estudios de inmunofluorescencia (IF) que las células cromafines están acopladas a través de Cx50 (Willenberg et al., 2006). La expresión de la Cx36 no ha sido investigada en glándula suprarrenal de humano (Willenberg et al., 2006).

3.9.2. Acople eléctrico entre células cromafines adultas.

Como se ha mencionado se ha encontrado por estudios electrofisiológicos que la mayoría de las células cromafines de agregados disociados de la médula de ratón así como de rebanadas de médula suprarrenal de rata están acopladas eléctricamente.

En condiciones normales, se ha demostrado al registrar pares de células cromafines de glándula suprarrenal de rata macho, que el 40 % está acoplada eléctricamente con conductancias de unión promedio de 0.2 nS lo que se considera como un acople eléctrico débil (Colomer et al., 2008). En condiciones basales caracterizadas por una baja frecuencia de descarga del nervio esplácnico, algunas células son estimuladas con Ach. Esta excitación eléctrica puede propagarse a las células vecinas y de esta forma inducir un influjo simultáneo de calcio en grupos de células cromafines lo que amplifica la liberación de catecolaminas, aun cuando no todas las células cromafines estén inervadas por un botón sináptico (Martin et al., 2001). Esto

abre la posibilidad de que la despolarización de una célula pueda activar potenciales de acción en células adyacentes como consecuencia de este acoplamiento eléctrico (Desarmenien et al., 2013).

3.9.3. Expresión de conexinas en las células cromafines durante el desarrollo fetal y perinatal.

Se sabe por estudios de microscopia electrónica que las UC están presentes en la médula suprarrenal fetal. Además se ha encontrado que las proteínas de la Cx36 se expresan ampliamente entre las células cromafines embrionarias y fetales de ratón ex vivo (Pérez 2007). Lo anterior indica que las células cromafines inicialmente están coordinadas entre sí principalmente a través de UC cuya formación precede a la formación de sinapsis químicas entre el nervio frénico y la médula suprarrenal. No obstante estos estudios aún no han demostrado que la expresión de la Cx36 sea modulada durante el desarrollo pre y perinatal.

En el periodo neonatal las células cromafines de rata están intercomunicadas eléctricamente y este acople se modula con la inervación (Figura 8). Interesantemente el grado de acople eléctrico entre las células cromafines disminuye durante el desarrollo postnatal coincidiendo con el establecimiento de las sinapsis químicas funcionales. Específicamente, en estudios de doble fijación de voltaje de pares aislados de células y en rebanadas de médula se ha encontrado que las células cromafines de ratas machos recién nacidos están acopladas eléctricamente en un 65 %, mientras que su número disminuye al 40 % en el estado adulto (Colomer et al., 2009).

También este acoplamiento fue determinado por difusión de amarillo de lucifer (LY), la probabilidad de observar la difusión de este colorante entre las células cromafines fue significativamente mayor en neonatos que en adultos (0.6 vs 0.4, respectivamente; $P < 0.01$) También la distribución espacial del LY es mayor en las células cromafines de neonatos comparada con ratas adultas, después de microinyectar el colorante en un agregado celular. Este número fue de 4 a 5 células

cromafines adyacentes teñidas en neonatos, mientras que el acoplamiento fue confinado a 1 ó 2 células en las ratas adultas (Martin et al., 2003). Las uniones comunicantes están implicadas en la propagación de eventos eléctricos célula-célula con el subsecuente incremento de Ca^{2+} simultáneo en las células cromafines vecinas. En un estudio con un colorante de calcio, se observó que el número de células en las cuales había un incremento simultáneo de calcio intracelular fue más alto (5 a 6) en neonatos con respecto a adultos (2) en rebanadas de células cromafines (Martín et al., 2001).

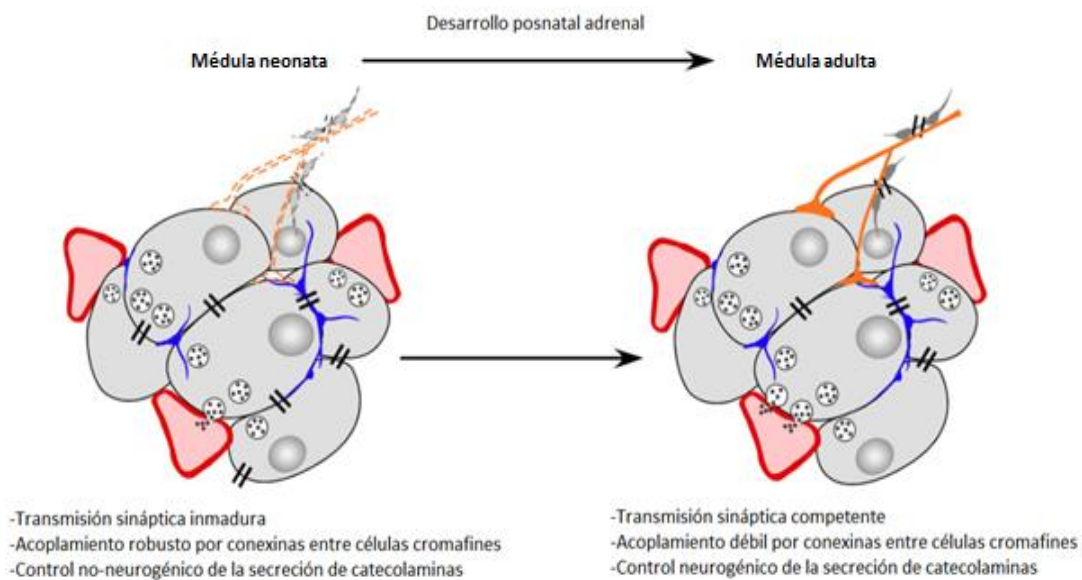


Figura 8. Esquema que muestra el remodelado de la comunicación por canales de conexinas durante el desarrollo posnatal. Tomado de Desarmenien et al., 2013.

Por estudios de acople eléctrico se ha propuesto la hipótesis de que en ausencia de inervación durante la etapa perinatal existe un posible mayor número de uniones comunicantes, mientras que este número se reduce en la etapa posnatal temprana cuando ocurre la inervación a través de sinapsis químicas (Guérineau y Desarmenien, 2010).

3.9.4. Canales de unión comunicante y exocitosis de catecolaminas en la médula suprarrenal.

En glándulas endocrinas se ha postulado que las UC regulan la liberación hormonal (Meda et al., 1993). Esto ha podido ser analizado en mayor detalle en las células beta pancreáticas en las cuales se ha demostrado que la delección de la Cx36 inhibe la formación de UC, lo que a su vez induce un aumento en la secreciones basales y secundarias de insulina como consecuencia de alteraciones en la coordinación de cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por glucosa y en los respectivos pulsos de secreción de insulina de un islote. Más aún, genera animales intolerantes a la glucosa demostrando la relevancia de las UC en la función endocrina-pancreática (Pérez-Armendariz 2013).

En las células cromafines falta demostrar el impacto de las UC en la función. No obstante las evidencias reportadas permiten postular que las UC también son reguladoras de la secreción. La estimulación de una sola célula cromafín provoca el incremento simultáneo de $[Ca^{2+}]_i$ en células adyacentes. Esto resulta de la propagación de la despolarización a las células vecinas y la activación respectiva de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en las células vecinas, como se ha observado *in vitro* (Colomer et al., 2012), con el respectivo influjo simultáneo de calcio en más de una célula. Esto es, se genera una onda de calcio entre las células cromafines vecinas a aquella que recibe la inervación sináptica química.

En cuanto a la secreción basal, las células cromafines tienen un potencial de membrana relativamente bajo de -65 a -55 mv (Nassar-Gentina et al., 1997). En condiciones basales existe una activación espontánea de los canales de Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje de estas células lo que induce cambios pasajeros en la $[Ca^{2+}]_i$ y consecuentemente la liberación espontánea de catecolaminas de éstas células. En condiciones *in vivo*, es posible que los cambios eléctricos generados en una célula se transmitan a algunas vecinas y generen un cambio secretorio conjunto que determine la secreción basal. Esta posibilidad es sugerida por los estudios en

condiciones fisiológicas-patológicas en las cuales se ha encontrado que cambios en la secreción de catecolaminas ocurren asociados a cambios en los niveles de expresión de Cxs. En particular, como se describió arriba hay un aumento en los niveles de expresión de las Cx36 y Cx43 normalmente expresadas en la médula de la rata asociado a un incremento en la secreción de catecolaminas en condiciones de estrés (Colomer et al., 2008) También, como se señaló anteriormente, por la alteración de conexinas en tumores de la médula suprarrenal asociados a incrementos en la producción de catecolaminas, en los cuales se ha observado una disminución de la Cx50 y una aparente expresión de *novo* de la Cx26 (Willenberg et al., 2006).

3.9.5. Interacción entre la transmisión sináptica y el acople por unión comunicante.

En el roedor la inervación colinérgica madura en la vida temprana durante los primeros 7 días de vida posnatal. Existe la hipótesis de que las sinapsis químicas inhiben el número o actividad de las uniones comunicantes. Esta idea proviene como ya se citó, de la reducción en el porcentaje de acople eléctrico registrado entre las células cromafines de animales recién nacidos a adultos. Esta inhibición está determinada por la acción de la Ach en su receptor nicotínico. En células cromafines de rebanadas de médula suprarrenal de rata incubadas por 30 min en presencia de bloqueadores farmacológicos de los receptores postsinápticos nicotínicos como hexametonio (200 μ M) y α -bungarotoxina (1.5 μ M) se han encontrado diferentes evidencias que indican esta inhibición. En particular a) se registró un incremento en el acople eléctrico por estudios de fijación de voltaje a -80 mV b) también un aumento en la transferencia del colorante fluorescente amarillo de Lucifer (LY) entre las células cuando fueron expuestas a hexametonio y α -bungarotoxina, determinado por microscopía confocal c) y aumento el número de células cromafines que presentaron un cambio de calcio intracelular cuando una de estas fue expuesta a agonistas de Ach como nicotina por aplicación iontoforética.

En respuesta al estrés crónico, la comunicación sináptica y por unión comunicante se somete a un remodelado funcional, resultando en un incremento de actividad sináptica en células cromafines. Lo anterior se ha demostrado en ratas estresadas por frío, que la densidad de inervación aumenta, éste aumento es detectado por IF del neurofilamento de 200 kDa que es específico de las fibras neuronales que inervan las células cromafines, además de que los potenciales de acción espontáneos se registran en el 82.6 % de las células de ratas estresadas mientras que sólo el 27.5 % de las células en ratas control registran potenciales de acción espontáneos. Además hay un incremento en la frecuencias de descarga espontáneas (4.42 ± 0.16 Hz, $n = 209$ contra 2.85 ± 0.11 Hz, $n = 142$ en condiciones de estrés y control, respectivamente), esto refleja un incremento en la excitabilidad celular y por lo tanto un incremento en la inervación de la médula suprarrenal (Colomer et al., 2008). Bajo éstas condiciones, el acoplamiento mediado por conexinas puede estar implicado en ayudar a las células cromafines en coordinar sus actividades eléctricas y de calcio, esto puede representar un complemento eficiente de la transmisión sináptica para amplificar la liberación de catecolaminas (Colomer et al., 2009).

3.9.6. Uniones comunicantes y glándula suprarrenal en condiciones de cambios en el estrés fisiológico.

3.9.6.1. Durante el parto.

Durante la transición de la vida intrauterina al nacimiento, los sujetos están expuestos a varios factores de estrés. Estos incluyen hipoxia, hipoglucemia o glicopenia. Durante este periodo la médula adrenal ejerce una función protectora muy específica permitiendo sobrevivir a los recién nacidos, en particular contra la hipoxia. Se sabe que la hipoxia induce cambios en el flujo membranar de iones de Ca^{2+} debidos a la existencia de diferentes tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en las células cromafines. En el adulto éstas incluyen a los canales tipo L y a los canales tipo R, Q y T (Carbone et al., 2006). Estos canales tienen diferente umbral a los cambios de voltaje. Los más sensibles o que se activan al voltaje menos depolarizado (-55 mV) son los canales tipo T. Se ha demostrado que la hipoxia induce una mayor expresión de canales tipo T en las células cromafines de rata fetales (Carabelli et al., 2007), en tal forma que la hipoxia induce un influjo mayor de iones calcio al interior de las células con lo cual se induce una mayor secreción de catecolaminas. Otros segundos mensajeros que se incrementan durante la hipoxia son las especies reactivas de oxígeno (ROS) favoreciendo la secreción de catecolaminas. Estos dos mensajeros son difusibles a través de las uniones comunicantes, por lo que su aumento puede ser distribuido a través de las UC e inducir una mayor secreción de catecolaminas. Por lo tanto, se ha propuesto que la comunicación a través de canales formados por conexinas pudieran estar facilitando la difusión de calcio intracelular así como de otras señales de hipoxia (ROS puede ser un candidato) a la población entera de células cromafines, contribuyendo a desencadenar una masiva liberación de catecolaminas.

3.9.6.2. En condiciones de estrés por frío.

En modelos de estrés pseudo-crónico en los cuales se ha expuesto a ratas por 5 días a 4 °C se ha reportado que existe un aumento en la secreción de catecolaminas. Asociado a este cambio también las siguientes evidencias indican que el acoplamiento por uniones comunicantes también está incrementado entre las células cromafines en animales estresados (exposición al frío):

- i) La expresión de Cx36 y Cx43 determinada por Western blot se incrementa en ratas estresadas con respecto a ratas control (Colomer et al., 2008).
- ii) Hay un incremento en el número promedio de células cromafines a las cuales difunde el trazador fluorescente intercelular LY en rebanadas de glándula suprarrenal de animales estresados (n= 382 pares de células, 82.2 % del total registrado) con respecto a aquéllas de animales control (n=122 pares de células, 18 % del total), cuando éste colorante es expuesto en secciones de rebanadas de médula suprarrenal (Colomer et al., 2008).
- iii) El estrés pseudo-crónico induce un incremento en los porcentajes de células fuertemente acopladas con respecto a las débilmente acopladas eléctricamente en ratas. Por estudios de doble fijación de voltaje en pares aislados de células cromafines se ha encontrado que los porcentajes de células cromafines fuertemente acopladas (5 nS) y débilmente acopladas (0.25 nS) son del 50 % y 50 %, respectivamente. En contraste en los animales control estas fracciones son del 1 % y 98 % respectivamente (Colomer et al., 2008).
- iv) El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por la aplicación iontoforética de nicotina sobre una sola célula cromafín de rebanadas de médula adrenal ocurre simultáneamente en un número promedio mayor de células vecinas (n = 55, 81.8 % del total de grupos determinados) en rebanadas de ratas estresadas que en ratas control (n = 27, 63 % del total de grupos determinados) (Colomer et al., 2008) .

Lo anterior, permite considerar que el incremento en la comunicación intercelular esta interrelacionado con el aumento en la secreción de catecolaminas que se ha determinado en animales estresados (Colomer et al., 2008).

4. ANTECEDENTES.

Estudios previos realizados en la glándula suprarrenal del ratón adulto han documentado que las células cromafines de la médula generan potenciales de acción y están acopladas eléctricamente tanto en acúmulos *in vitro* como en glándulas completas micro-disecadas (Nassar-Gentina et al., 1997). Se sabe que en el roedor (ratón y rata) adulto este acople resulta de la expresión de la Cx36 en forma semejante a las células excitables del sistema nervioso central; incluyendo la médula espinal, el tálamo, el hipocampo (Degen et al., 2004) así como las células β del páncreas (Moreno et al., 2005) que también son excitables. También, este acople resulta de la expresión de la Cx43 en la médula suprarrenal de la rata. Más aún se ha documentado que la estimulación de un célula de un agregado de células cromafines inducida por un agonista del receptor nicotínico aplicado a través de una micropipeta, induce cambios de $[Ca^{2+}]_i$ coordinadores en varias células cromafines (Martin et al., 2001). El acople eléctrico y la sincronización de señales de calcio en grupos de células cromafines en principio favorecería la secreción coordinada de adrenalina (Martin et al. 2001). Además como se ha resumido anteriormente, se ha encontrado que condiciones que inducen incrementos en la producción de catecolaminas, como el estrés del nacimiento o el estrés inducido por frío así como en el crecimiento anómalo de las células cromafines o feocromocitoma ocurren asociadas a cambios en los niveles de conexinas o tipos de conexinas que expresan. Lo anterior sugiere que las UC están implicadas en la regulación de la secreción de catecolaminas.

5. JUSTIFICACIÓN.

Durante la etapa fetal, se sabe que tanto el cortisol como las catecolaminas juegan un papel fisiológico determinante para la sobrevivencia del producto al nacimiento. A diferencia del animal adulto, existe escasa información sobre las UC en la médula suprarrenal del sujeto prenatal y perinatal. En estudios previos, se encontró que la proteína y el transcrito de la Cx36, pero no la Cx43, se expresan en las células cromafines de glándula suprarrenal del ratón desde las etapas más tempranas del desarrollo fetal al día 13 dpc (Pérez 2007; Pérez et al., 2008) esto es, al tiempo que son englobadas por el tejido mesodérmico que genera la corteza suprarrenal. Más aún, se encontró evidencia de que su expresión aumenta con el desarrollo fetal por estudios de IF. Su expresión tan temprana y su incremento aparente durante la etapa fetal sugieren que la Cx36 además de regular la secreción de catecolaminas puede jugar un papel en la diferenciación o maduración de las células cromafines. No obstante, estos cambios en la expresión de esta conexina no fueron cuantificados, dado el tamaño pequeño de las glándulas durante el periodo embrionario y fetal. A fin de cuantificar y demostrar que su expresión es modulada durante el desarrollo fetal y perinatal en la presente tesis se cuantificaron sus niveles utilizando la técnica de Reverso transcripción-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

También a fin de tener mayores evidencias que apoyen la idea de que su expresión puede estar correlacionada con la diferenciación y o maduración de las células cromafines en esta tesis se investigó en paralelo el cambio en la expresión del transcrito de la PNMT por qRT-PCR, ya que es la enzima responsable de la conversión de la noradrenalina a adrenalina durante la vida fetal y perinatal, como un marcador de la diferenciación y maduración de estas células.

6. HIPÓTESIS.

La Cx36 es un gen de expresión temprana en las células cromafines fetales que es regulado a la alta durante la vida fetal y perinatal en forma correlacionada a su diferenciación y/o maduración en la glándula suprarrenal de ratón.

7. OBJETIVOS.

7.1. Objetivo general.

Cuantificar la expresión del transcrito de la proteína de unión comunicante Cx36 y de la enzima PNMT durante el desarrollo embrionario y después del parto en las células cromafines de la glándula suprarrenal del ratón.

7.2. Objetivos particulares.

- a) Determinar los niveles relativos de expresión del mRNA de la Cx36 utilizando la técnica de qRT-PCR a los 13 días post coitum (dpc), 18 dpc y 3 días después del parto (dpp).
- b) Determinar los niveles de expresión del mRNA del gen específico de las células cromafines feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) normalizado con respecto al gen constitutivo Rn 18s utilizando la técnica de qRT-PCR a los 13 dpc, 18 dpc y 3 dpp.
- c) Analizar si existe una correlación en los niveles de expresión de los transcritos de la Cx36 con la expresión del gen de diferenciación de las células cromafines *Pnmt*.

8. MATERIALES Y MÉTODOS.

8.1. Disección de animales y obtención de las muestras.

Se utilizaron ratones hembras de la cepa CD1 del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales se mantuvieron y manejaron de acuerdo con las guías y principios nacionales e internacionales para la Investigación Biomédica en Animales, promulgadas por la Sociedad para el Estudio de la Reproducción. Las hembras preñadas mostraron un tapón vaginal después de 2 a 3 horas después del apareamiento, en éstas hembras se consideró esta condición como día 0 de embarazo.

Las hembras de 13 y 18 dpc fueron anestesiadas por medio de inhalación de éter en un contenedor para posteriormente ser sacrificadas por decapitación. A continuación se obtuvieron por microdisección glándulas suprarrenales de embriones y fetos, las cuales fueron separadas de la grasa envolvente y agrupadas en tubos con trizol mantenidas a 4 °C. Para la edad de 13 dpc se incluyeron 6 muestras; cada muestra compuesta de 16 glándulas provenientes de 8 embriones. Para la edad 18 dpc cada muestra incluyó 16 glándulas provenientes de 8 sujetos diferentes; la edad también compuesta por 6 muestras. Para las edades posnatales se registró el día del parto como el día 0 y se sacrificó por decapitación a los neonatos al 3 dpp, cada muestra incluyó un total de 6 glándulas que provenían de 6 diferentes animales. También se utilizaron ratones adultos de tres meses de edad de los cuales se obtuvo RNA para realizar las curvas de calibración de los genes. Cada una de estas muestras incluyó las dos glándulas de cada animal. Para cada edad de desarrollo en el estudio se analizaron 6 muestras. Una vez disecadas las glándulas se homogenizaron en 300 µL de trizol (Invitrogen) y se congelaron en nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA.

8.2. Extracción de RNA.

Las muestras a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ se descongelaron y se les agregaron $700\text{ }\mu\text{L}$ de trizol e incubaron a temperatura ambiente por 5 min. A cada tubo se le adicionó $200\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo y enseguida se agitaron vigorosamente por 15 s en vortex. Se incubaron a temperatura ambiente por 3 min, se centrifugó la muestra a 12000 rpm por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de la centrifugación de la mezcla (fenol-cloroformo) se separó la fase acuosa (superior) que contiene al RNA de la fase orgánica (fondo del tubo) y de la interfase. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se agregaron $500\text{ }\mu\text{L}$ de 2-propanol para precipitar el RNA agitando por inversión del tubo. Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente por 10 min, después se centrifugaron a 11000 rpm por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ con lo que se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se agregó 1 mL de etanol al $70\text{ }\%$ v/v para lavar el RNA y en seguida se agitó por inversión. Se centrifugaron las muestras a 9000 rpm por 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El RNA quedó precipitado en el fondo del tubo. Se eliminó el sobrenadante y el RNA se secó en la campana de flujo laminar por 10 min. El RNA se disolvió en $40\text{ }\mu\text{L}$ de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC). Las muestras se incubaron en el termoblock por 10 min a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. Antes de guardar las muestras de RNA a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se tomaron $10\text{ }\mu\text{L}$ para su posterior verificación de integridad y cuantificación.

8.3. Verificación de la integridad del RNA y cuantificación.

De las muestras de RNA aislados se cargaron $3\text{ }\mu\text{L}$ en un gel de agarosa al $1.2\text{ }\%$ p/v en buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X . El RNA fue separado en una cámara horizontal a la cual se le aplicó una diferencia de potencial de 75 V . Los geles fueron analizados en el transiluminador donde se observaron dos bandas intensas que corresponden a las subunidades 28 S y 18 S de RNA ribosomal. Los RNA que se encontraron íntegros se cuantificaron en un espectrofotómetro (Beckman Coulter), programado para la cuantificación de ácidos nucleicos en las longitudes de onda de $260/280\text{ nm}$. Se prepararon por triplicado las diluciones de RNA ($1:50$) en un volumen final de $100\text{ }\mu\text{L}$. El cero del equipo se ajustó leyendo inicialmente agua destilada. El volumen total de las muestras de RNA diluido fue colocado en la microcelda y leído por triplicado. Previo lavado de la microcelda se procedió a leer

la siguiente muestra. Las muestras de RNA que presentaban una relación de absorbancia (A) de 260/280 de 1.8-2.1 fueron consideradas con un alto grado de pureza y por lo tanto útiles para su transcripción reversa. Para determinar la concentración de los RNA se multiplicó la A₂₆₀ x 40 x 50 (factor de dilución).

8.4. Transcripción reversa.

A fin de prevenir la contaminación por DNA genómico, el RNA fue previamente tratado con DNasa. Para esto cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL que contuvieron: 2 µg de RNA, 2 µL de DNasa I (1 U/µL, Invitrogen) 2 µL de buffer de DNasa I (Tris-HCl 200 mM (pH 8.4), MgCl₂ (20 mM), KCl (500 mM), 1 µL de inhibidor de RNasas (10 U/µL, Invitrogen) y el volumen necesario de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) para completar el volumen final. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 15 min, tiempo al cual se agregaron 2 µL de ácido etildiaminotetraacético (EDTA, 25 mM pH 8.0, Invitrogen) y después se llevó al termoblock a 65 °C por 10 min.

Posteriormente el RNA se reverso-transcribió utilizando el kit SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix for qRT-PCR (Invitrogen). Brevemente; en un volumen final de 20 µL, 1 µg de RNA se mezcló con 8 µL de buffer de reacción que incluye: Oligo (dT)₂₀ (2.5 µM), oligonucleótidos al azar (2.5 ng/µL), MgCl₂ (10 mM) y dNTPs y 2 µL de la mezcla de enzimas reverso transcriptasa e inhibidor de ribonucleasa. Se usó un termociclador GenAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems, el programa de ciclaje utilizado fue de: 25 °C por 10 min, 50 °C por 30 min y 85 °C por 5 min. Al final las muestras se incubaron con un microlitro de RNasa H (2 U/µL) a 37 °C por 20 min.

8.5. PCR de punto final de Gapdh.

Como un control para verificar la calidad del cDNA sintetizado se realizó un PCR de punto final amplificando el gen de expresión constitutiva Gapdh. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

GAPDH sentido	5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC-3'
GAPDH antisentido	5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3'

Se realizaron reacciones que contenían MgCl₂ (25 mM), dNTPs (200 μM), oligonucleótidos sentido (forward) y antisentido (reverso) (10 μM), Taq polimerasa (5 U/μL), 2 μL de cDNA (50 ng/ μL) y se aforó a un volumen final de 20 μL con H₂O DEPC (11.8 μL). A fin de reducir el error en el pipeteo se realizó una sola mezcla de los reactivos anteriores, cuyo volumen dependía del número de reacciones que se realizaban. Una vez hecha la mezcla se agregaban a cada tubo 18 μL y al final se agregaban los 2 μL de cDNA correspondiente. Para su amplificación se utilizó el siguiente programa de ciclaje: un paso inicial de activación de 90 °C por 2 min, seguido de 40 ciclos constituidos por cambios de 94 °C por 15 s (desnaturalización del cDNA), 60 °C por 30 s (hibridación) y 72 °C por 1 min (extensión), así como por un paso final de 72 °C de 10 min. Como equipos y reactivos para los PCR de punto final de Gapdh se utilizó un Termociclador GeneAmp PCR System 9700, Gold Amplitaq polimerasa (Applied Biosystems): contiene Amplitaq (5 U/μL), Buffer 10X y MgCl₂; dNTPs (Applied Biosystems) y H₂O DEPC (Ambion). Posteriormente, se verificó que las muestras de cDNA hubiesen amplificado un producto de 115 pares de bases correspondiente al peso esperado para el amplicón de la Gapdh. Para esto, los productos de PCR se mezclaron con 5 μL de buffer de carga y en un gel de agarosa al 1.2 % se corrieron los productos cargando 10 μL de producto de PCR por pozo así como 3 μL de marcador molecular en otro pozo y una muestra de una reacción en la cual en lugar de cDNA se agregó solo agua y que por lo tanto fue el control negativo.

8.6. qRT-PCR.

La expresión de los genes se cuantificó mediante qRT-PCR utilizando sondas Taqman (Applied Biosystems): Cx36 (Mm00439121m1), Pnmt (Mm00476993_m1), RNA ribosomal 18S (Mm03928990_g1) y Gapdh (Mm99999915_g1). El cDNA de 6 muestras diferentes de glándulas adrenales se exploró en reacciones por duplicado, en un volumen final de 10 μ L, el cual incluyó 2 μ L de cDNA (50 ng/ μ L), 5 μ L de Taqman Gene Expression Master Mix, 0.5 μ L de sonda Taqman 20X y 2.5 μ L de agua DEPC (Ambion). La cuantificación del mRNA se realizó en un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), el programa de ciclaje fue de: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, y 40 ciclos consistiendo de 30 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. El análisis de los genes se realizó con curvas estándar relativas para cada gen, construidas a partir de diluciones seriadas (175 a 0.0175 ng) de cDNA de glándulas suprarrenales de animales adultos. Los valores relativos del transcrito se obtuvieron interpolando los valores de Ct en las curvas de calibración. La expresión de los genes se normalizó respecto al gen constitutivo Rn 18 S y Gapdh.

8.7. Preparación de la curva estándar relativa.

Una vez que se verificó que los cDNA amplificaron bien el gen constitutivo Gapdh mediante PCR de punto final, se procedió a hacer la curva estándar relativa. Para que esta fuese una curva representativa se hizo una mezcla de los cDNA de glándula suprarrenal de adulto (n = 6). De esta se obtuvieron diluciones sucesivas de la mezcla de cDNA de 1:10 en agua DEPC, a fin de obtener las siguientes concentraciones: Punto A (175 ng), punto B (17.5 ng) punto C (1.75 ng), punto D (0.175 ng) y punto E (0.0175 ng).

Dependiendo de las reacciones a realizar se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos:

Reactivo	Punto curva patrón (μL)	Curva patrón por duplicado (μL)	Muestra (μL)	Muestras (μL)
	1 reacción	5 reacciones por duplicado	1 muestra	6 muestras por duplicado (4 grupos)
Taqman GEx 20X	0.5	5.25	0.5	24.25
Master mix 2X	5	52.5	5	242.5
cDNA	3.5	--	2	--
H ₂ O DEPC	1	10.5	2.5	121.25
Volumen final	10	--	10	--

Tabla 3. Reactivos para PCR en tiempo real.

8.8. Análisis estadístico.

A los datos obtenidos se les realizó un análisis estadístico, primero a través de la prueba Shapiro-Wilk para determinar si los datos eran de distribución normal, al comprobarse que no son de distribución normal se compararon los grupos de datos con la prueba no paramétrica de Mann Whitney. Se utilizó el programa SigmaPlot 12.0. En todas la pruebas estadísticas se utilizó un intervalo de confianza del 95 % por lo que se consideraron como estadísticamente significativos aquellos datos que tuvieron un valor de $p < 0.05$.

9. RESULTADOS.

9.1. Extracción de RNA total.

En los primeros aislamientos se trabajó en la estandarización del método de extracción por trizol, ya que los RNAs se mostraban degradados. (Figura 9: carriles 1, 2, 3 y 4 que contienen RNA total de glándula suprarrenal de ratón adulto). La figura 10 y 11 muestran que tras la adecuada estandarización del protocolo de extracción y purificación todas las muestras de RNAs aislados estaban libres de degradación ya que las bandas 28 S y 18 S presentan buena preservación.

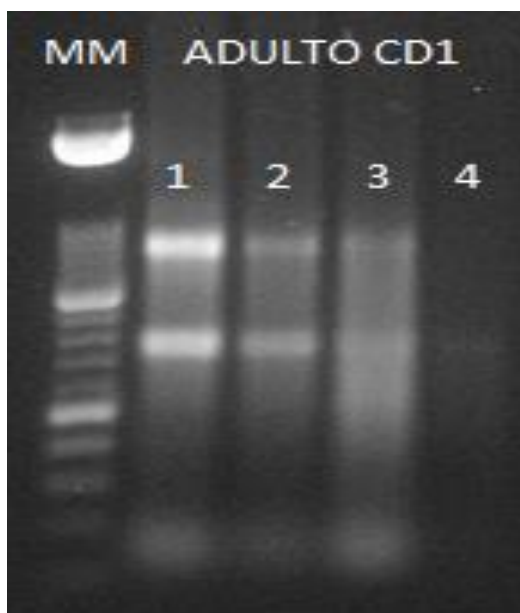


Figura 9. Gel de agarosa al 1.2 % mostrando RNA degradado de glándula suprarrenal de ratón adulto.

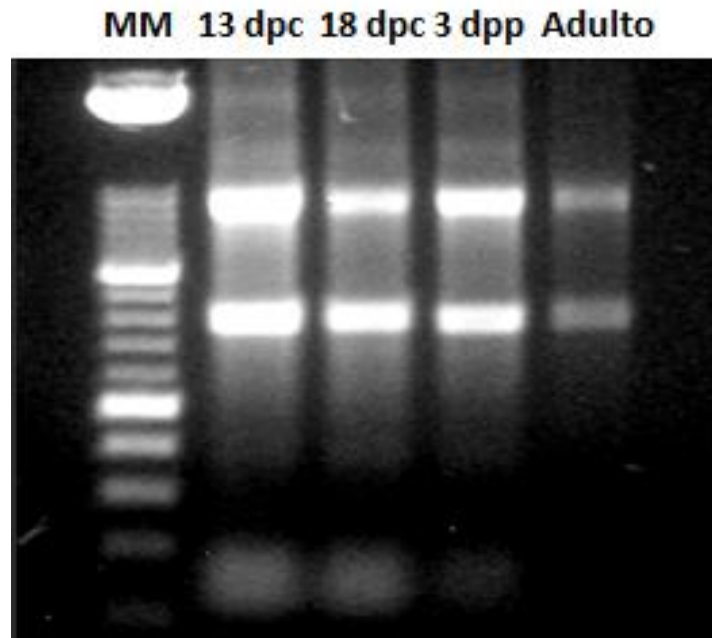


Figura 10. Gel representativo de 4 muestras de RNA, una muestra por edad 13 dpc, 18 dpc, 3 dpp y Adulto en su carril respectivo.

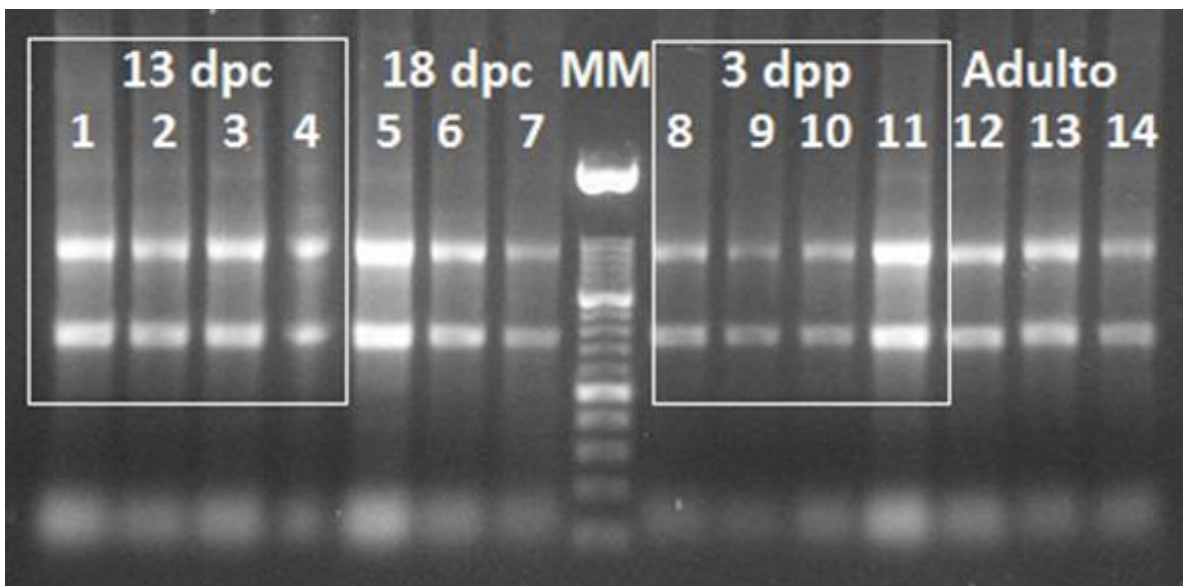


Figura 11. Gel de agarosa representativo del RNA utilizado para cada edad (4 carriles correspondientes a 13 dpc, 3 carriles de 18 dpc, 4 carriles de 3 dpp y 3 carriles correspondientes a RNA de Adulto).

9.2. PCR de punto final.

Como un control para verificar la calidad del cDNA sintetizado se realizó un PCR de punto final amplificando el gen de expresión constitutiva Gapdh. En la figura 12 se muestran amplificados de tres muestras de cada edad, notando que las bandas corresponden aproximadamente en tamaño a la banda de 115 pares de bases del gen constitutivo Gapdh.

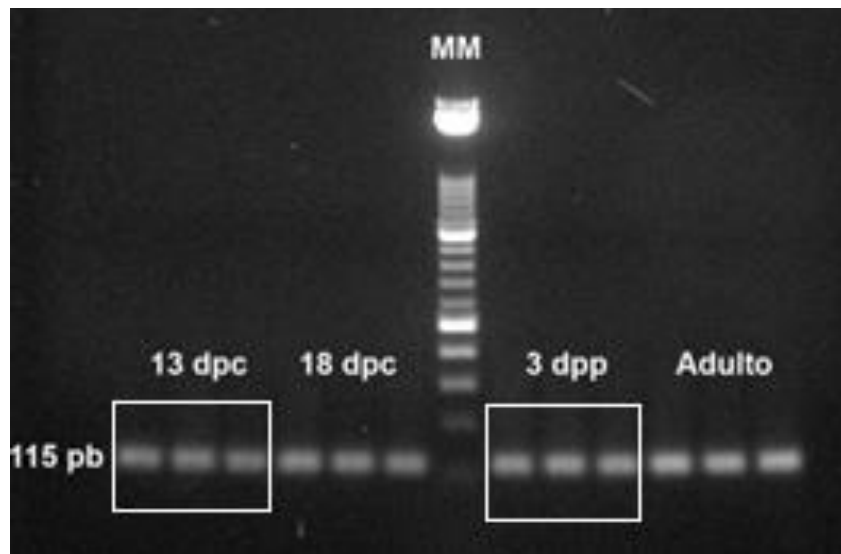


Figura 12. Amplificados del gen constitutivo Gapdh en geles de agarosa al 1.2 %.

9.3. Niveles de expresión de Cx36.

La figura 13 muestra que la expresión relativa del mRNA de Cx36 en glándulas suprarrenales de ratón es similar entre las edades 13 y 18 dpc, no obstante, se puede apreciar que ocurre un aumento significativo en la edad 3 dpp.

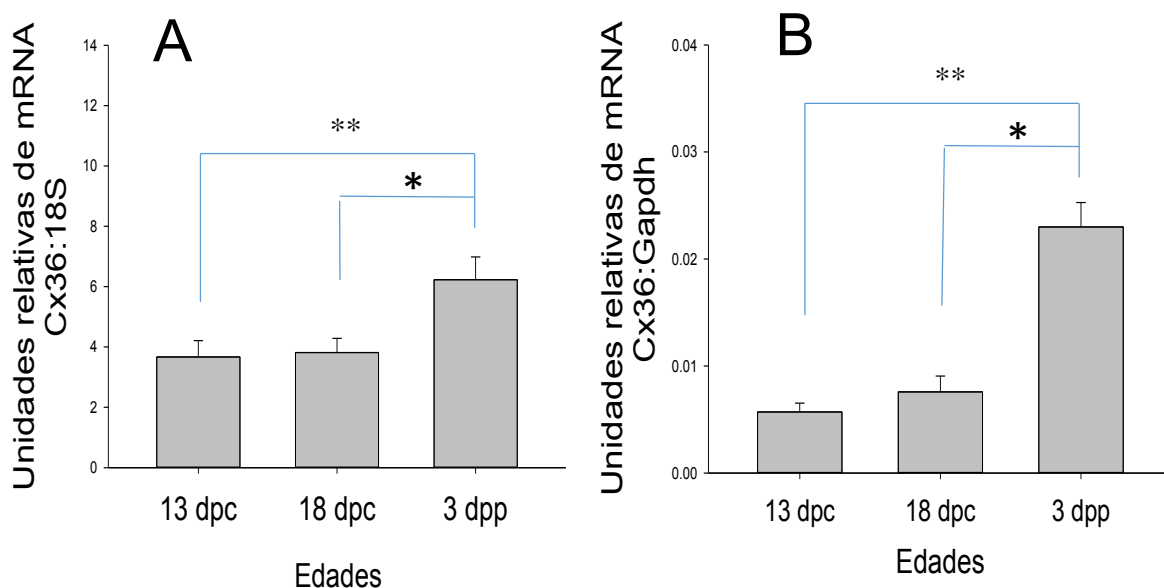


Figura 13. Incremento en la expresión del mRNA de la Cx36 en las células cromafines de la médula suprarrenal del ratón durante el periodo fetal (13 y 18 dpc) al neonatal (3 dpp). Cada barra representa la expresión de la Cx36 normalizada respecto a los genes constitutivos 18 S (A) y Gapdh (B). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar. * = $p < 0.05$ y ** = $p < 0.009$, $n = 6$.

9.4. Niveles de expresión de Pnmt.

La figura 14A muestra que que existe un incremento progresivo de los niveles de expresión del mRNA de PNMT en de este gen en una forma correlacionada con la edad con se normaliza con 18 S. La misma tendencia se observa en el panel B al normalizar los datos con el gen Gapdh. Estas diferencias son estadísticamente significativas entre todas las edades del estudio.

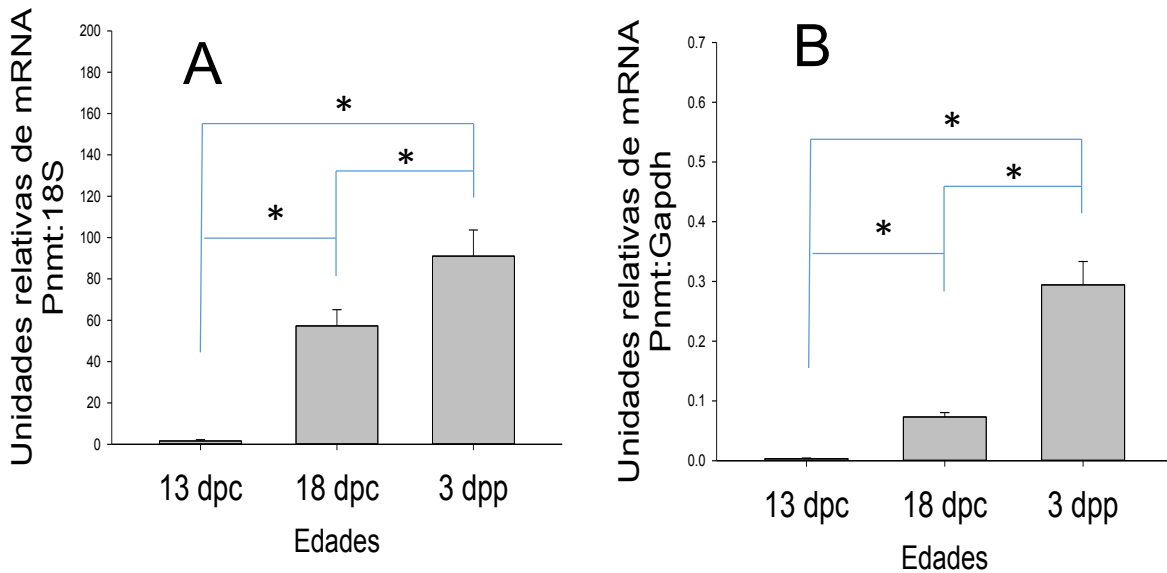


Figura 14. Incremento en la expresión del mRNA de la PNMT en las células cromafines de la médula suprarrenal del ratón durante el periodo fetal (13 y 18 dpc) al neonatal (3 dpp). Cada barra representa la expresión de la PNMT normalizada respecto a los genes constitutivos 18 S (A) y Gapdh (B). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar. * = $p < 0.001$, $n = 6$.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Se sabe que los gránulos de catecolaminas son detectados ya en etapa fetal a partir del día 13 dpc. No obstante no hay información clara sobre cuando comienza esta glándula a liberar sus productos a la sangre fetal. Los resultados aquí obtenidos utilizando la técnica de qRT-PCR demuestran claramente que el transcrito de la Cx36 se está expresando en células de la médula suprarrenal desde las edades embrionarias/fetales más tempranas del desarrollo de la glándula adrenal fetal. Este resultado es consistente con detecciones de su transcrito y RTPCR de punto final (Pérez 2007). Esto aunado a la detección de la proteína a este mismo periodo (Pérez 2007), lo que indica que esta conexina es requerida por las células cromafines en alguna función muy temprana de su desarrollo. Lo anterior sugiere que su expresión más bien está asociada al desarrollo de estas células. Estudios previos han propuesto que la Cx36 puede estar aumentando la diferenciación y maduración de las células excitables. Esto se propuso con base a resultados en las células beta pancreáticas fetales en las cuales ocurre un incremento en la expresión de este gen en una forma que depende de la edad fetal y perinatal asociada a una mayor síntesis de insulina (Pérez-Armendariz 2013).

También, estudios previos de nuestro laboratorio en vías de publicación documentaron que la marca fluorescente anti-Cx36 Isotiocianato de fluoresceína (FITC) aumenta progresivamente en la médula suprarrenal de glándulas de ratón entre los días 13, 16 y 18 dpc. Sin embargo, este cambio no se había cuantificado a nivel de mRNA. En este trabajo buscamos demostrar este aspecto y cuantificar este cambio. También buscamos contestar si el incremento en la expresión de la proteína de la Cx36 observado por IF durante el desarrollo fetal y perinatal, resultaba de un aumento en la transcripción del gen de la Cx36. Para investigar este aspecto utilizamos qRTPCR a partir del RNA de glándula suprarrenal total a dos edades de desarrollo fetal; una temprana a los 13 dpc y una tardía a los 18 dpc. Nuestros resultados indican que en este periodo no se alcanza una diferencia estadísticamente significativa en la expresión del mRNA de este gen. El tamaño de

nuestra muestra de RNA fue suficientemente grande ya que incluyó 48 animales al día 13 dpc (seis muestras con 16 glándulas u ocho animales cada una) y 48 ratones al día 18 dpc (seis muestras de ocho animales cada una). La calidad del RNA utilizado se corroboró que fue adecuada por estudios de electroforesis y espectrofotometría. Más aún, utilizando este grupo de RNAs pudimos documentar por primera vez que el gen de la PNMT también se expresa desde el día 13 dpc en la glándula suprarrenal del ratón y que su expresión aumenta con la edad fetal y perinatal al día 3 dpp. Lo anterior, además de demostrar por primera vez la expresión de este gen desde la etapa más temprana del desarrollo de la médula suprarrenal en el ratón, documenta que al igual que en la oveja (Adams et al., 1998) su expresión aumenta con la edad. De lo anterior, la falta de detección de un cambio en la expresión del gen de la Cx36 en el periodo fetal sugiere que el cambio de expresión en la proteína detectado por estudios de IF en la etapa fetal (Pérez 2007) resulta de un cambio postraduccional. En contraste con la etapa fetal los resultados de esta tesis demuestran que si hay una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de expresión del transcrito de la Cx36 de la edad fetal (13 dpc) a término (18 dpc) con respecto al día 3 dpp. Este aumento en la expresión del transcrito en la Cx36, correlaciona con el aumento en la expresión de su proteína detectado por estudios de (IF) (Pérez 2007; Pérez et al., 2008). Lo anterior indica que hay un cambio en la transcripción de este gen en esta etapa de desarrollo. Encontramos que este cambio está asociado con un incremento mayor en la expresión del gen de la PNMT. La enzima PNMT como se ha citado antes, es la enzima encargada de sintetizar la A a partir de la NA. Lo anterior sugiere que esta modulación está asociada a la maduración de las células cromafines. Dado que se ha documentado que durante el parto aumenta importantemente la liberación de catecolaminas y cortisol, es difícil en este momento proponer cuál de los diferentes cambios fisiológicos que ocurren durante el parto es el que está determinado el cambio en la expresión tanto de la PNMT como de la Cx36. El incremento en la Cx36 esta correlacionado con esta mayor demanda de secreción de catecolaminas requerida durante el parto. Este resultado está de acuerdo con hipótesis previas de que las UC participan como un factor amplificador de las señales intracelulares que

favorecen la secreción de catecolaminas y de esta forma pueden contribuir a generar una mayor coordinación entre las células cromafines a fin de tener una mayor secreción a un tiempo dado.

Estos cambios ocurren relacionados al estrés provocado por la hipoxia que sufre este mamífero durante el parto, ya que estudios anteriores y recientes demuestran que la expresión de las uniones comunicantes aumenta en modelos de estrés, tales como exposición al frío y la propia hipoxia. En el mismo contexto, al nacimiento la transmisión sináptica entre las terminales nerviosas y las células cromafines madura hasta una semana después, el aumento en la PNMT durante el desarrollo embrionario y perinatal indica la maduración de las células cromafines fetales ya que su aumento es necesario para incrementar la síntesis de adrenalina y su secreción durante el parto. Como hecho inherente a la secreción de catecolaminas se encuentra el aumento de los niveles de calcio intracelular, niveles que se ven mayormente coordinados al aumento del acoplamiento entre células cromafines por uniones comunicantes, ya que está establecido que el Ca^{2+} puede atravesar el canal intercelular formado por conexones de Cx36. Por lo anterior es razonable proponer que el parto, además de otros factores, de alguna forma induce el aumento de la expresión de canales de unión comunicante, canales implicados en el acople eléctrico y en el aumento de la actividad de calcio intracelular, actividad imprescindible para la secreción de catecolaminas.

11. CONCLUSIÓN.

Las células cromafines embrionarias y fetales expresan el transcrito de Cx36, los datos muestran que su expresión esta principalmente incrementada con el desarrollo perinatal en una forma asociada a la diferenciación y/o maduración de estas células. Dado que tanto el transcrito de la Cx36 y PNMT aumentan durante el periodo del nacimiento, estos resultados indican que la Cx36 está participando en el incremento de la producción de catecolaminas que ocurre durante el parto.

12. REFERENCIAS.

- Acuna, C., Guo, Q., Burré J., Sharma, M., Sun, J. y Südhof, T.C. (2014). "Microsecond Dissection of Neurotransmitter Release: SNARE-Complex Assembly Dictates Speed and Ca²⁺ Sensitivity." Neuron 82(5): 1088-1100.
- Adams, M.B., Phillips, I.D., Simonetta, G. y McMillen, I.C. (1998). "Differential effects of increasing gestational age and placental restriction on tyrosine hydroxylase, phenylethanolamine N-methyltransferase, and proenkephalin A mRNA levels in the fetal sheep adrenal." J Neurochem 71(1):394-401.
- Bergoffen, J., Scherer, S.S., Wang, S, Scott M.O., Bone, L.J., Paul, D.L., Chen, K., Lensch, M.W., Chance, P.F. y Fischbeck, K.H. (1993). "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." Science 262(5142):2039-2042.
- Bloomfield, S.A. y Völgyi B. (2009). "The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina." Nat Rev Neurosci. 10(7):495-506
- Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., de Luca, A., Díaz, J., Borges, R. y Carbone, E. (2007). "Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells." J Physiol 584(Pt 1):149-165.
- Carbone, E., Giacippoli, A., Marcantoni, A., Guido, D. y Carabelli, V. (2006). "A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis." Cell Calcium 40(2):147-154.
- Cohen, W.R., Piasecki, G.J., Cohn, H.E., Young, J.B. y Jackson, B.T. (1984). "Adrenal secretion of catecholamines during hypoxemia in fetal lambs." Endocrinology 114(2):383-390.

- Colomer, C., Desarménien, M.G. y Guérineau, N.C. (2009). "Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: role of gap junction-mediated intercellular communication." Mol Neurobiol 40(1): 87-100.
- Colomer, C., Lafont, C., y Guérineau, N.C. (2008). "Stress-induced intercellular communication remodeling in the rat adrenal medulla." Ann N Y Acad Sci 1148(10): 106-111.
- Colomer, C., Martin, A.O., Desarménien, M.G. y Guérineau, N.C. (2012). "Gap junction-mediated intercellular communication in the adrenal medulla: an additional ingredient of stimulus-secretion coupling regulation." Biochim Biophys Acta 1818(8): 1937-1951.
- Chamoux, E., Otis, M. y Gallo-Payet, N. (2005). "A connection between extracellular matrix and hormonal signals during the development of the human fetal adrenal gland." Braz J Med Biol Res 38(10): 1495-1503.
- Debuse, M. (2004). Lo esencial en el sistema endocrino y aparato reproductor, 2ª Ed. Elsevier. España.
- De Maio, A., Vega, V.L. y Contreras, J.E. (2002). "Gap junctions, homeostasis, and injury." J Cell Physiol 191(3): 269-282.
- Degen, J, Meier, C., Van Der Giessen, R.S., Söhl, G., Petrash-Parwez, E., Urschel, S., Dermietzel, R., Schilling, K., De Zeeuw, C.I. y Willecke K. (2004). "Expression pattern of lacZ reporter gene representing connexin36 in transgenic mice." J Comp Neurol 473(4): 511-525.
- Desarménien, M.G., Jourdan, C., Toutain, B., Vassieres, E., Hormuzdi, S.G. y Guérineau, N.C. (2013). "Gap junction signalling is a stress-regulated

component of adrenal neuroendocrine stimulus-secretion coupling in vivo." Nat Commun 4:2938.

Evans, W. H. y Martin, P.E. (2002). "Gap junctions: structure and function." Mol Membr Biol 19(2): 121-136.

Erickson, J.D., Schafer, M.K., Bonner, T.I., Eiden, L.E. y Weihe, E. (1996). "Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter." Proc Natl Acad Sci U S A 93(10):5166-5171.

Fox, S.I. (2008). Glándulas endocrinas: Glándulas suprarrenales. En: Fisiología Humana, 10ª Ed. México: Mc Graw Hill.

Fujieda, K. y Tajima, T. (2005). "Molecular basis of adrenal insufficiency." Pediatr Res 57(5 Pt 2): 62R-69R.

Ganong, W. (2006). Médula y corteza suprarrenales. En: Fisiología médica, 2da Ed. México: El Manual Moderno.

Goodenough, D.A. y Paul D.L. (2009). " Gap junctions." Cold Spring Harb Perspect Biol. 1(1):a002576.

Goodenough, D. A. y Stoeckenius, W. (1972). "The isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Preliminary chemical characterization and x-ray diffraction." J Cell Biol 54(3): 646-656.

Guerineau, N. C. y Desarmenien, M.G. (2010). "Developmental and stress-induced remodeling of cell-cell communication in the adrenal medullary tissue." Cell Mol Neurobiol 30(8): 1425-1431.

- Hammer, G.D., Parker, K.L. y Shimmer, B.P. (2005). "Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development." Endocrinology 146(3): 1018-1024.
- Huber, K. (2006). "The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives." Dev Biol 298(2): 335-343.
- Kiiveri, S., Liu, j., Westerholm-Ormio, M., Narita, N., Wilson, D.B., Voutilainen, R. y Heikinheimo, M. (2002). "Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue." Endocrinology 143(8): 3136-3143.
- Kronenberg, H. (2009). "Williams: tratado de endocrinología" Elsevier. 11^a Ed. España.
- Lu, S.J., Li,H., Zhou, F.H., Zhang, J.J. y Wang, L.X. (2007). "Connexin 36 is expressed and associated with zonula occludens-1 protein in PC-12 cells." Gen Physiol Biophys 26(1):33-39.
- Lohr, J., Gut, P., Karch N., Unsicker, K., y Huber, K. (2006). "Development of adrenal chromaffin cells in Sf1 heterozygous mice." Cell Tissue Res 325(3): 437-444.
- Martin, A.O., Mathieu, M.N., Chevillard, C. y Guérineau, N.C. (2001). "Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release." J Neurosci 21(15): 5397-5405.
- Martin, A.O., Mathieu, M.N. y Guérineau, N.C. (2003). "Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells." J Neurosci 23(9):3669-3678.

- McDonald, T.J., Li, C., Massmann, G.A. y Figueroa, J.P. (2003). "Connexin 43 ontogeny in fetal sheep adrenal glands." Steroids 68(7-8): 613-620.
- Meda, P., Pepper, M.S., Traub, O., Willecke, K., Gros, D., Beyer, E., Nicholson, B., Paul, D. y Orci, L. (1993). "Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands." Endocrinology 133(5): 2371-2378.
- Mesiano, S. y Jaffe, R.B. (1997). "Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex." Endocr Rev 18(3): 378-403.
- Mochizuki-Oda, N., Takeuchi, Y., Matsumura, K., Oosawa, Y. y Watanabe, Y. (1997). "Hypoxia-Induced Catecholamine Release and Intracellular Ca²⁺ Increase via Suppression of K⁺ Channels in Cultured Rat Adrenal Chromaffin Cells." J Neurochem 69(1):377-387.
- Moreno, A. P., Berthoud, V.M., Pérez-Palacios, G. y Pérez-Armendariz, E.M. (2005). "Biophysical evidence that connexin-36 forms functional gap junction channels between pancreatic mouse beta-cells." Am J Physiol Endocrinol Metab 288(5): E948-956.
- Murayama, T., Oba, T., Katayama, E., Oyamada, H., Oquchi, K., Kobayashi, M., Otsuka, K. y Ogawa, Y. (1999). "Further characterization of the type 3 Ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm." J Biol Chem. 274:17297–17308
- Nassar-Gentina, V., L. Catalan, L. y Luxoro, M. (1997). "Nicotinic and muscarinic components in acetylcholine stimulation of porcine adrenal medullary cells." Mol Cell Biochem 169(1-2): 107-113.
- Nicholson, B. J. (2003). "Gap junctions - from cell to molecule." J Cell Sci 116(Pt 22): 4479-4481.

- Orthmann-Murphy, J.L., Enriquez, A.D., Abrams, C.K. y Scherer, S.S. (2007).
“Loss-of-function GJA12/Connexin47 mutations cause Pelizaeus-Merzbacher-like disease.” Mol Cell Neurosci. 34(4):629-641.
- Oyamada, M., Oyamada, Y. y Takamatsu, T. (2005). "Regulation of connexin expression." Biochim Biophys Acta 1719(1-2): 6-23.
- Payne, A. H. y Hales, D.B. (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev 25(6): 947-970.
- Paznekas, W.A., Karczeski, B., Vermeer, S., Lowry, R.B., Delatycki, M., Laurence, F., Koivisto, P.A., Van Maldergem, L., Boyadjiev, S.A., Bodurtha, J.N. y Jabs, E.W. (2009). “GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype.” Hum Mutat 30(5):724-733.
- Pérez, Armendariz, E.M., Romano, M.C., Luna, J., Miranda, C., Benneth, M.V. y Moreno, A.P. (1994). “Characterization of gap junctions between pairs of Leydig cells from mouse testis.” Am J Physiol 267(2 Pt 1):C570-580.
- Pérez-Armendariz, E.M. (2013). “Connexin 36, a key element in pancreatic beta cell function.” Neuropharm 75:557-566.
- Pérez, Armendariz, E.M., Cruz, Miguel, L., García, león, C. Salaiza, Suazo, N., Pérez, Venegas, A., Verdugo, Díaz, L., Hernández, Cruz, A. y Aguilar, Esparza, M. “Evidencia de una amplia red de intercomunicación celular mediada por uniones comunicantes en las células de la corteza y médula suprarrenal fetal del roedor. LI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 7-11 septiembre, Yucatán, Mérida 2008.

- Pérez, Venegas, A. (2007). "Identificación de las conexinas expresadas en la glándula adrenal fetal.". FES Cuautitlán. **UNAM**, Junio 18, 2007.
- Pfenniger, A., Wohlwend, A. y Kwak, B.R. (2011). "Mutations in connexin genes and disease". Euro J Clinical Res 41 (1): 103-116.
- Pocock G. y Richards (2002). Fisiología humana; La base de la medicina. Masson. 2da. Ed. Barcelona.
- Ratcliffe, J., M. Nakanishi y Jaffe, R.B. (2003). "Identification of definitive and fetal zone markers in the human fetal adrenal gland reveals putative developmental genes." J Clin Endocrinol Metab 88(7): 3272-3277.
- Saez, J.C., Berthoud, V.M., Branes, M.C., Martinez, A.D. y Beyer, E.C. (2003). "Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions." Physiol Rev 83(4):1359-1400.
- Segretain, D. y Falk, M.M. (2004). "Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal." Biochim Biophys Acta 1662(1-2): 3-21.
- Seidler, F. J. y Slotkin, T.A. (1985). "Adrenomedullary function in the neonatal rat Responses to acute hypoxia." J Physiol 381: 1-16.
- Söhl, G., Maxeiner, S. y Willecke, K. (2005). "Expression and functions of neuronal gap junctions." Nat Rev Neurosci 6(3):191-200.
- Souvannakitti, D., Nanduri, J., Yuan, G., Kumar, G.K., Fox, A.P. y Prabhakar, N. R. (2010). "NADPH oxidase-dependent regulation of T-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors mediate the augmented exocytosis of catecholamines

from intermittent hypoxia-treated neonatal rat chromaffin cells." J Neurosci 30(32): 10763-10772.

White, T. W. y Paul, D.L. (1999). "Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions." Annu Rev Physiol 61: 283-310.

Willenberg, H.S., Schott, M., Saeger, W., Tries, A., Scherbaum, W.A. y Bornstein, S.R. (2006). "Expression of Connexins in Chromaffin Cells of Normal Human Adrenals and in Benign and Malignant Pheochromocytomas". N Y Acad Sci 1073:578-583.

Wong, D.L. (2006). "Epinephrine Biosynthesis: Hormonal and Neural Control During Stress." Cell Mol Neurobiol 26(46):891-900.

Yamasaki, H., Mesnil. M., Omori. Y., Mironov, N. y Krutovskikh, V. (1995). "Intercellular communication and carcinogenesis." Mutation Res 333(1-2):181-188.

Yen, S. Jaffe, R. y Barbieri, R. (2001). Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ª ed. Panamericana.