

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

EL PAPEL POLIFACÉTICO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES GABAA EN

LAS CÉLULAS CROMAFINES DE RATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA MILDRED TZITZITLINI ALEJANDRE GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM

> COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM

> > DR. SALVADOR HERNÁNDEZ LOPÉZ FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX. ENERO, 2019



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

i



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

EL PAPEL POLIFACÉTICO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES GABAA EN

LAS CÉLULAS CROMAFINES DE RATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA MILDRED TZITZITLINI ALEJANDRE GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM

> COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM

> > DR. SALVADOR HERNÁNDEZ LOPÉZ FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2019

COORDINACIÓN



OFICIO CPCB/1194/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence Directora General de Administración Escolar, UNAM P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina en su sesión ordinaria del día 01 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS de la alumna, ALEJANDRE GARCÍA MARÍA MILDRED TZITZITLINI con número de cuenta 302297067 con la tesis "El papel polifacético de la activación de los receptores GABA_A en las células cromafines de rata", realizada bajo la dirección de la DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ:

Presidente:	DR. MIGUEL PÉREZ DE LA MORA
Vocal:	DR. JUAN CARLOS GOMORA MARTÍNEZ
Secretario:	DR. JOSÉ BARGAS DÍAZ
Suplente:	DR. RODOLFO DELGADO LEZAMA
Suplente:	DR. FREDY ROBERTO CIFUENTES NAVARRO

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

A T E N T A M E N T E "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU" Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 11 de diciembre de 2018



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA COORDINADOR DEL PROGRAMA

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

Unidad de Posgrado · Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas Edificio D, 1er. Piso, Circuito de Posgrados Cd. Universitaria Delegación Coyoacán C.P. 04510 México, D.F. Tel. 5623 7002 http://pcbiol.posgrado.unam.mx

Agradecimientos

Gracias por el apoyo otorgado a:

El Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto, con el número (CVU/Becario): 287725 / 269644. De la fecha 01 agosto del 2014 hasta el 31 de Julio del 2018.

Los proyectos que apoyaron este trabajo: **DGAPA** (IN211616) periodo 01/2013 - 12/2018 y **CONACyT** (240305) periodo 06/2015 - 05/2018.

Mi tutor, el **Dr. Arturo Hernández Cruz** del IFC (UNAM) por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio. Por su apoyo, su paciencia, sus enseñanzas y todas sus aportaciones al desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco a los miembros de mi comité tutoral por su gran apoyo durante mi formación académica, por sus valiosas observaciones y sugerencias a este trabajo:

Dr. José Bargas Díaz del IFC (UNAM).

Dr. Salvador Leonardo Hernández López de la Facultad de Medicina (UNAM)

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que hicieron posible el desarrollo de este trabajo:

Al **Dr. Jesús Pérez Ortega** del INB (UNAM), por su todo su apoyo en el manejo de los datos y por las productivas horas de discusión y mutuo aprendizaje.

Al **Dr. Pedro Segura Chama** del Instituto Nacional de Psiquiatría, por su invaluable apoyo y guía durante mi formación académica y su participación activa en este proyecto.

Al **Dr. Nicolás Jiménez Pérez** del IFC (UNAM), por su asistencia y apoyo técnico brindado dentro del laboratorio.

A la **Dra. María Luisa Durán Pasten** de la LaNCa (UNAM), por su tiempo y paciencia al instruirme técnicamente en los registros de fluorescencia.

Al **Dr. Uri Ramírez Jarquin** del Scripps Institute Research, Florida, por su proactividad y disposición de ayudarme siempre con las inmunofluorescencias.

A la Q.F.B. Johanna Peña del Castillo, por su asesoría con los registros de amperometría.

Al **Dr. Rodolfo Delgado Lezama** del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias (CINVESTAV), por sus valiosas aportaciones al proyecto.

A la **Dra. María Chávez Canales** del Instituto Nacional de Cardiología, por sus propuestas y participación activa en el proyecto.

A la **Dra. Ruth Rincón Heredia** de la unidad de Imagenología (IFC), por la disponibilidad en su asistencia y apoyo técnico.

Al técnico académico **Dagoberto Tapia Ramírez** del IFC (UNAM), por su asistencia y apoyo técnico en el laboratorio.

A la **M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo** directora del Bioterio del IFC (UNAM), por su apoyo técnico con los animales del laboratorio.

A la **Biol. Diana Millan Aldaco** del IFC (UNAM), por su asistencia y apoyo técnico en el laboratorio.

Mis compañeros y amigos del laboratorio: La Dra. Claudia Sánchez, el Biol. Daniel

Bahena y Aida Servín.

A los miembros de mi Jurado por su gran ahínco en la revisión de mi tesis:

- Dr. Miguel Morales Mendoza
- Dr. Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
- Dr. Dr. José Bargas Díaz
- Dr. Dr. Rodolfo Delgado Lezama
- Dr. Fredy Roberto Cifuentes Navarro

Al **Instituto de Fisiología Celular** por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A las personas que iluminan mi vida:

Mis padres: Adelaida García y José Alejandre

Mis hermanos: Juan Pablo, Yolitzin Isabel y José Máximo

> Mi maravilloso esposo: Jesús Pérez Ortega

Índice

R	esumen	1	
Α	Abstract		
Ir	Introducción		
•	Sistema Nervioso Simpático	3	
•	Sistema GABAérgico	4	
•	Síntesis del GABA en la médula adrenal	5	
•	Función del GABA en las CCs	6	
Ρ	lanteamiento del problema	12	
Ρ	reguntas	12	
Н	ipótesis	12	
0	Objetivo General 1		
0	bjetivos Particulares	12	
N	létodos	14	
•	Obtención de rebanadas de glándula adrenal	14	
•	Registro de señales de Ca ²⁺ i en CCs de rebanada de glándula adrenal	15	
•	Análisis de Imágenes	16	
•	Estimulación eléctrica	17	
•	Registro electrofisiológico	19	
	a) Potencial de membrana	19	
	b) Registro de Corrientes Post-sinápticas Excitadoras	20	
	 c) Registro e las post-hiperpolarizaciones (PHP) de los potenciales de acción 	20	
•	Inmunofluorescencia	21	
•	Registros amperométricos de la liberación de catecolaminas	22	
•	Fármacos	23	
	Análisis estadísticos	23	
R	esultados	24	

•	Efecto de la activación de los R-GABA _A por muscimol en la concentración de Ca ²⁺ _i y potencial de membrana en CCs	24			
	Las señales de Ca ²⁺ , inducidas por activación del R-GABA _A en las CCs				
	depende de la presencia de Ca ²⁺ extracelular				
•	Las señales de Ca ²⁺ i inducidas por activación de los R-GABA _A en las CCs	29			
	dependen de la presencia de Cl ⁻ extracelular	25			
•	Los co-transportadores NKCC1 no parecen ser los responsables de				
	mantener elevada la concentración de Cl ⁻ i en las CCs				
•	Factores involucrados en las respuestas diversas de las CCs por				
	activación del R-GABA _A	34			
•	La activación tónica de los R-GABA _A por el GABA endógeno modula los				
	transitorios espontáneos de Ca ²⁺ i	50			
-	Efectos de la bicuculina en la post-hiperpolarización de los potenciales	40			
	de acción en las CCs				
•	El GABA endógeno no inhibe a las CCs por un cambio en la resistencia	41			
	de entrada	. –			
•	Los transitorios de Ca^{2+}_{i} inducidos por bicuculina en las CCs, son	43			
	independientes de la respuesta a muscimol				
•	Las entradas sinápticas colinérgicas contribuyen a la generación de				
	transitorios espontáneos de Ca ²⁺ i en las CCs				
•	GABA endógeno regula la función de las CCs al actuar sobre los R-				
	GABA _A de las terminales pre-sinápticas colinérgicas				
•	GABA endógeno inhibe las señales Ca ²⁺ i de las CCs estimuladas	50			
	sinápticamente por el nervio esplácnico				
D	iscusión	53			
•	Efectos de la activación del R-GABA _A con muscimol en las CCs	53			
•	El GABA endógeno regula la función de las CCs al actuar sobre los R-	55			
	GABA _A en la pre- y post-sinapsis	55			
•	Los R-GABA _A regulan la inhibición pre-sináptica en la médula adrenal	56			
Conclusión					
Bibliografía					

Resumen

El papel del ácido gamma-aminobutírico (GABA) en la función de las células cromafines (CCs) de la médula adrenal aún está en discusión. Se sabe que el GABA se almacena en los gránulos de núcleo denso que contienen catecolaminas y que, por esa razón, también se libera en conjunto con las catecolaminas, ATP y opioides, en respuesta a estímulos fisiológicos, desempeñando un papel autocrino/paracrino en las CCs. La paradójica "acción dual" de la activación del receptor $GABA_A$ (potenciación de la secreción de catecolaminas e inhibición de la liberación de catecolaminas inducida por un estímulo sináptico) es solo un aspecto de las acciones polifacéticas del GABA. En este trabajo de investigación se llevaron a cabo experimentos en las CCs de rata, que sugieren que la función del GABA en las CCs puede depender de las necesidades fisiológicas del organismo, por ejemplo: la activación aguda de receptores GABA_A (R-GABA_A) es despolarizante en aproximadamente el 50% de las CCs, y por lo tanto GABA, al actuar como un mediador autocrino/paracrino, podría ayudar a mantener la exocitosis de catecolaminas inducida por una situación de estrés. La activación de los R-GABA_A no es excitadora en aproximadamente la mitad de la población de las CCs, en cambio las hiperpolariza o no genera respuesta. Este porcentaje posiblemente varía, dependiendo de las demandas funcionales, ya que las acciones mediadas por el R-GABA_A están determinadas por la concentración de cloruro intracelular y ésta, a su vez, depende de la actividad de los transportadores de catión-cloruro. No obstante, durante condiciones no estresantes, la activación de R-GABAA por el GABA endógeno, inhibe tónicamente la liberación de acetilcolina (ACh) de las terminales del nervio esplácnico y disminuye los transitorios espontáneos de calcio intracelular en las CCs, evitando la secreción no deseada de catecolaminas. Durante el estrés intenso el GABA endógeno también inhibe a las terminales del nervio esplácnico y, por lo tanto, la liberación de ACh sobre las CCs se encuentra disminuida por GABA. Estos hallazgos subrayan la compleja regulación mediada por GABA en la función CCs y su secreción de catecolaminas.

Abstract

The role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in adrenal medulla chromaffin cells (CCs) function is just beginning to unfold. GABA is stored in catecholamines-containing dense core granules and is presumably released together with catecholamines, ATP, and opioids in response to physiological stimuli, playing an autocrine/paracrine role on CCs. The reported paradoxical "dual action" of GABAA receptor activation (enhancement of catecholamines secretion and inhibition of synaptically evoked catecholamines release) is only one aspect of GABA's multifaceted actions. In this thesis, we discuss recent physiological experiments on rat CCs which suggest that GABA regulation of CCs function may depend on the physiological context: acute activation of GABA_A-R is depolarizing in about 50% of CCs, and thus GABA, acting as an autocrine/paracrine mediator, could help to maintain catecholamines exocytosis under stress. GABAA-R activation is not excitatory in about half of CCs' population because it hyperpolarizes them or elicits no response. This percentage possibly varies, depending on functional demands, since GABA_A-R-mediated actions are determined by the intracellular chloride concentration and therefore on the activity of cation-chloride co-transporters, which is functionally regulated. During nonstressful conditions, GABA_A-R activation by endogenous GABA tonically inhibits acetylcholine release from splanchnic nerve terminals and decreases spontaneous intracellular calcium fluctuations in CCs, preventing unwanted catecholamines secretion. During intense stress, splanchnic nerve terminals release acetylcholine, which depolarizes CCs and allows the calcium influx that triggers the release of catecholamines and GABA. During these conditions, endogenous GABA also inhibits the splanchnic nerve terminals, therefore, GABA decreases the release of acetylcholine on the CCs. These findings underscore a potential importance of a complex GABA-mediated regulation of CCs function and its catecholamines secretion.

Sistema Nervioso Simpático

El **Sistema Nervioso Simpático**, es una de las divisiones del Sistema Nervioso Autónomo (involuntario). Su función predomina en situaciones de estrés, cuando el cuerpo necesita responder a cambios que alteran la estabilidad del medio interno del organismo como: el estrés emocional, el combate, la variación intensa de la temperatura o una hemorragia; estas reacciones de emergencia o conductas de **lucha o huida** se caracterizan por: aumentar la estimulación al corazón, los vasos periféricos y las glándulas sudoríparas (Cannon, 1929).

Una de las glándulas que recibe inervación simpática es **la médula adrenal**. El nervio esplácnico inerva y libera acetilcolina (ACh) directamente en **las células cromafines** (CCs) adrenérgicas y noradrenérgicas de la médula adrenal. La actividad de este sistema determina el tono simpático, el cual estimula la liberación de catecolaminas de las CCs manteniendo una concentración basal en sangre (Douglas, 1968). Durante el estrés agudo, la actividad simpato-adrenal aumenta hasta 30 veces. Esto contribuye a mantener la homeostasis corporal durante la exposición a estímulos extremos (Landsberg y Young 1985).

El mecanismo mediante el cual se secretan las catecolaminas de las CCs es la **exocitosis**; el contenido vesicular de las células es liberado al espacio extracelular e inmediatamente alcanza el torrente sanguíneo, a través del cual llegan a su órgano blanco. Por esta razón, se considera que los contenidos vesiculares de las CCs funcionan como **hormonas** (Schäfer, 1895).

El sistema de control y eliminación de las catecolaminas se lleva a cabo en cuestión de minutos en los diferentes compartimientos celulares, por mecanismos de recaptura, o degradación por oxidasas de monoaminas (MAO, por sus siglas en inglés) o por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (Tipton, 1973). Este mecanismo de degradación ha sido

interpretado como una protección del organismo frente a una acción excesiva de las catecolaminas que puede ser potencialmente letal para el organismo (Verdugo, 2005).

En ese sentido, se sabe que una respuesta inadecuada del organismo al estrés agudo es perjudicial; ya que una liberación incontrolada de catecolaminas por las CCs puede provocar crisis hipertensivas, arritmias e insuficiencia renal. Por esa razón, se ha puesto especial atención a los mecanismos que regulan la exocitosis en las CCs, por ejemplo, en distintos neurotransmisores co-liberados con las catecolaminas (Dunlap y Fischbach, 1981) como: péptidos opioides (encefalinas); purinas (ATP); dopamina-beta-hidroxilasa (DBH); cromograninas (Viveros *et al.*, 1982; Winkler y Westhead, 1980). Estos transmisores inhiben la secreción de catecolaminas al inducir la disminución de la **concentración de calcio intracelular (Ca²⁺i)**. Una de las moléculas estudiadas en distintos trabajos y a la cual se le atribuye un papel relevante y controversial en la regulación de la secreción de catecolaminas en las CCs es el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Los hallazgos presentados en esta tesis ilustran la importancia del **sistema GABAérgico** en la médula adrenal como un factor que controla la secreción de catecolaminas en las CCs.

Sistema GABAérgico

El GABA es un neurotransmisor principalmente inhibitorio del sistema nervioso central. El GABA es sintetizado a partir de glutamato por medio de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD).

Los efectos del GABA han sido ampliamente estudiados en diferentes tipos neuronales. Sin embargo, el GABA y sus receptores también se han encontrado en órganos periféricos como: intestino, vesícula, vejiga urinaria, corazón, vasos sanguíneos, pulmón, hígado, riñones, articulación de rodillas, útero, oviducto, ovario, tiroidea, páncreas y la médula adrenal (Martin del Rio y Caballero, 1980). En muchos de estos tejidos el papel del GABA es incierto, ya que el GABA puede actuar como un neurotransmisor pero también como hormona (Tanaka y Taniyama, 1992).

Las acciones del GABA son mediadas por la activación de sus receptores, uno de ellos: el

4

receptor ionotrópico GABA_A (R-GABA_A), es un complejo proteico pentamérico que forma un canal selectivo a Cl⁻. Este receptor es antagonizado por bicuculina (Barnard *et al.*, 1998; Macdonald y Olsen, 1994). El GABA también actúa a través de su unión con el receptor metabotrópico GABA_B (R-GABA_B), un receptor acoplado a proteínas G, a través de las cuales regula la función de canales de Ca²⁺ y K⁺ en las CCs (Bormann, 1988; Bowery, 1989).

Síntesis del GABA en la médula adrenal

Las glándulas adrenales son dos órganos endocrinos situados en la parte superior de cada riñón. En los mamíferos, las glándulas se componen de dos partes diferenciadas anatómica y funcionalmente, la corteza y **la médula**. Está reportado que las células de la corteza (adrenocorticales) no contienen GAD, sin embargo, en diversos trabajos se han observado evidencias que sugieren la síntesis del GABA en CCs de diferentes especies (Harada *et al.*, 2010; Iwasa *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 1984). Por otro lado, en la médula adrenal de rata también se ha observado la presencia de escasas neuronas colinérgicas (neuronas ganglionares) (Elnasharty y Sayed-Ahmed, 2014), estas neuronas también han mostrado inmunotinción a GABA (Kato *et al.*, 2014).

Las CCs secretan catecolaminas, principalmente adrenalina (90%) y en menor proporción noradrenalina (10%), al torrente sanguíneo de manera basal y en respuesta a un estímulo simpático (Perlman y Chalfie, 1992). Algunos estudios más detallados identificaron la presencia de la GABA y VGAT en el centro de los gránulos densos (vesículas) tanto de CCs adrenérgicas como noradrenérgicas (Harada *et al.*, 2010; Iwasa *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 1986). Esto sugiere que las catecolaminas y el GABA son co-liberados (Harada *et al.*, 2010; Oset-Gasque *et al.*, 1990), esta co-liberación podría ocurrir durante la actividad espontánea o en respuesta a la estimulación colinérgica. Por esta razón, el GABA podría encontrase en suficiente concentración en el espacio intersticial y estar jugando un papel autocrino/paracrino en las CCs (Harada *et al.*, 2016).

Las CCs reciben inervación simpática del **nervio esplácnico**, este nervio proviene de la médula espinal y libera ACh como neurotransmisor químico (Douglas, 1968). La presencia del GABA en el nervio esplácnico es aún controversial ya que se han encontrado fibras

nerviosas co-inmunoreactivas a colinacetiltransferasa (ChAT, enzima que sintetiza ACh a partir de Acetil-CoA y colina) y a GAD, en ratón y perro (Iwasa et al., 1998; Oomori et al., 2013). Estas fibras están en contacto con las CCs (Ahonen et al., 1989; Kataoka et al., 1984; Oomori et al., 1993), lo que sugiere que las terminales del nervio esplácnico co-liberan ACh y GABA (Iwasa et al., 1998; Kataoka et al., 1984). En el caso particular de la rata, se han encontrado fibras nervosas individuales GABAérgicas que en la mayoría de los casos no son co-inmunoreactivas a ChAT, estas fibras tienen un origen desconocido, sin embargo, se ha observado que atraviesan la corteza adrenal y están asociadas con vasos sanguíneos y células ganglionares en la médula adrenal, pero no a las CCs (Kato et al., 2014). Otras evidencias indican que las fibras nerviosas colinérgicas que inervan a las CCs de rata, no expresan GAD, ni el transportador vesicular de GABA (VGAT), lo cual sugiere que GABA no es sintetizado ni almacenado en vesículas sinápticas de las fibras aferentes que inervan a las CCs, pero sí hay evidencia de la presencia de GAD67 y VGAT en las CCs de rata (Harada et al., 2016; Matsuoka et al., 2008). De acuerdo con estudios electrofisiológicos, tampoco hay evidencia de transmisión sináptica GABAérgica en las CCs (Barbara et al., 1998; Kajiwara *et al.*, 1997).

A diferencia de lo que ocurre en el sistema nervioso central, en la médula adrenal están ausentes los mecanismos que se encargan de la recaptura y degradación de GABA que son: los transportadores de GABA (GATs) y de GABA transaminasa GABA-T, respectivamente (Matsuoka *et al.*, 2008). Esta condición podría favorecer la difusión y acumulación de GABA extracelular en el tejido adrenal, así como una mayor influencia del GABA en la modulación de la exocitosis de las catecolaminas.

Función del GABA en las CCs

Las CCs de la médula adrenal de rata en cultivo, generan espontáneamente potenciales de acción (Brandt *et al.*, 1976) e incrementos transitorios de Ca²⁺_i (**transitorios de Ca²⁺**_i) (Busik *et al.*, 1996; D'Andrea *et al.*, 1994). Los transitorios espontáneos de Ca²⁺_i son principalmente el resultado de la liberación de Ca²⁺ proveniente del retículo endoplásmico al citoplasma (D'Andrea *et al.*, 1994); esto también mantiene la secreción basal de

6

catecolaminas (Kidokoro y Ritchie, 1980).

Una vez que fue reportada la síntesis del GABA en las CCs, se comenzaron a explorar las respuestas a GABA, inicialmente se observaron los efectos de la inyección intravenosa de GABA, o del agonista específico muscimol y se observó que incrementaban la frecuencia cardiaca y la presión sanguínea en la rata. Estos efectos cardiovasculares fueron antagonizados por la adrenalectomía, lo que sugirió la participación de R-GABA_A de la médula adrenal (Amenta *et al.*, 1988).

Por otro lado, se realizaron registros electrofisiológicos de corrientes de Cl⁻ inducidas por la aplicación del GABA; también se distinguió que 100 μM de GABA inducen una despolarización transitoria de la membrana y un incremento en la frecuencia de los potenciales de acción (ráfagas de potenciales de acción, o *bursts* en inglés), seguida de una inhibición de la actividad eléctrica espontánea en el cultivo primario de CCs de rata. El GABA también indujo un breve aumento de la concentración de Ca²⁺i (posiblemente asociado a las rafagas de potenciales de acción) y después provocó la inhibición de transitorios espontáneos de aproximadamente 15 % de las células espontáneamente activas. Estás acciones fueron mimetizadas por muscimol, el agonista específico del R-GABA_A, y fueron bloqueadas por bicuculina, su antagonista específico (Busik *et al.*, 1996). Estos datos confirmaron la expresión de R-GABA_A funcionales en las CCs.

Las subunidades que constituyen al R-GABA_A en las CCs, fueron identificadas por medio de mRNA, y a nivel de proteína se detectaron las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 2 / \beta 3$, $\gamma 2 y \delta$ (Matsuoka *et al.*, 2008). La expresión de este tipo de subunidades sugiere propiedades farmacológicas específicas del receptor, como la facilitación por regulación alostérica inducida por diazepam (Bormann y Clapham, 1985), así como una alta afinidad del receptor al GABA y a neuroesteroides como la allopregnanolona (Belelli y Lambert, 2005; Peters *et al.*, 1989), que puede ser liberado de la zona reticularis de la corteza adrenal (Holzbauer *et al.*, 1985). En ese sentido, el tipo de subunidades que conforman a estos receptores puede ayudar a deducir los posibles efectos de la activación de los R-GABA_A en el tejido.

Aunque la activación de los R-GABA_A en neuronas en el Sistema Nervioso Central de organismos adultos induce principalmente hiperpolarización (inhibición), en neuronas de organismos inmaduros puede inducir despolarización (excitación). Esto se debe a que los efectos de GABA sobre el R-GABA_A están determinados por la fuerza impulsora del Cl⁻ generada por el gradiente transmembranal de Cl⁻ y su diferencia de potencial (potencial de equilibrio del Cl⁻, E_{Cl}) (Staley *et al.*, 1996).

En neuronas inmaduras del sistema nervioso central, así como en algunas células maduras como: las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Alvarez-Leefmans *et al.*, 1988) neuronas magnocelulares del hipotálamo (Kim *et al.*, 2011), neuronas del núcleo supraquiasmático (Choi *et al.*, 2008) y en las CCs, la activación de R-GABA_A induce despolarización debido a que el E_{CI} es menos negativo que el potencial de reposo de la membrana. Para el caso de las CCs de bovino el potencial de reposo de la membrana se encuentra entre -60 y -40 mV y se ha reportado que el E_{CI} es de -28 mV (Xie *et al.*, 2003). Esto indica que la concentración de Cl⁻₁ (Cl⁻₁) en estas células, es mayor con respecto a otras neuronas donde la activación del R-GABA_A promueve una hiperpolarización y, por tanto, una inhibición (Ben-Ari, 2002).

La acumulación intracelular de iones Cl⁻ en neuronas inmaduras, es generada por la actividad de dos diferentes miembros de la familia de co-transportadores, uno de ellos, es el co-transportaor de Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC1), cuyo transporte de Cl⁻ al interior de la célula es impulsado por los gradientes de concentración del sodio y potasio. Otro factor que contribuye a la acumulación de Cl⁻ es la escasa expresión de un segundo co-transportador de K⁺/Cl⁻ (KCC2), el cual, en neuronas maduras, mantiene la concentración de Cl⁻ baja (Ben-Ari, 2002). De manera muy similar a lo que sucede en neuronas inmaduras, en las CCs de bovino se reportó la expresión del co-transportador NKCC1 a nivel de proteína. También se observó una escasa o nula expresión del co-transportador KCC2 (Xie *et al.*, 2003). Estos dos factores en conjunto, podrían ser los responsables de ayudar a mantener la concentración de Cl⁻ elevada, lo que podría explicar que la activación de los R-GABA_A en las CCs induzca despolarización.

Las propiedades mencionadas anteriormente podrían explicar que la activación del R-GABA_A, genera potenciales de acción en las CCs (Peters *et al.*, 1989), también podría

8

explicar el incremento en la concentración de Ca²⁺_i por la activación de canales de calcio sensibles a voltaje (Xie *et al.*, 2003). Por esa razón, el GABA se encontraría facilitando la secreción de catecolaminas de las CCs (Sangiah *et al.*, 1974), estos resultados han sido confirmados por otros grupos de investigación (Gonzalez *et al.*, 1992; Kataoka *et al.*, 1984; Kitayama *et al.*, 1986).

En CCs de varias especies, la estimulación de los R-GABA_A, por aplicación del GABA o muscimol (agonista específico de GABA_A), resulta consistentemente en un aumento de la concentración de Ca²⁺_i y consecuentemente en un incremento en la secreción de catecolaminas. Sin embargo, aún es controversial la manera en la que el GABA regula a las CCs durante la estimulación por el nervio esplácnico.

Las primeras evidencias que hubo respecto a las acciones del GABA en la glándula adrenal *in vivo* surgieron de experimentos en perro, los cuales demostraron que la inyección de los agonistas del R-GABA_A en la médula adrenal, incrementaban la concentración de catecolaminas en el torrente sanguíneo. En contraste, durante la estimulación eléctrica del nervio esplácnico, la administración del GABA redujo la cantidad de catecolaminas liberadas (Kataoka *et al.*, 1986). Los experimentos con fluorescencia de Ca²⁺ⁱ en rata mostraron resultados similares en el tejido intacto (Inoue *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2008), en este caso, el incremento en la concentración de Ca²⁺ⁱ sugiere un incremento en la secreción de catecolaminas (García *et al.*, 2006). Con estas evidencias se propone que la activación del R-GABA_A promueve la secreción basal de catecolaminas mientras inhibe la secreción de catecolaminas inducida por la estimulación del nervio esplácnico.

Se ha reconocido "la acción dual" de la activación de los R-GABA_A (Matsuoka *et al.*, 2008) (Figura 1), debido a los efectos aparentemente contradictorios del GABA en la médula adrenal como son: el aumento de la secreción de catecolaminas y la inhibición de la secreción cuando ésta es inducida por estimulación sináptica (Iwasa *et al.*, 1998; Kowalczyk y Kulig 2014; Oomori *et al.*, 2013). Una hipótesis para explicar la "acción dual" sugiere que, como el potencial de equilibrio de GABA es despolarizante ($E_{GABA} \approx -38$ mV) con respecto al potencial de la membrana (~ -60 mV), la activación de los R-GABA_A potenciará la secreción de catecolaminas; y durante una despolarización mucho más grande como la que

podría producir la estimulación del nervio esplácnico (>-38 mV), el E_{GABA} será inhibitorio respecto al nuevo voltaje de membrana, que se traduciría en inhibición de la liberación de catecolaminas inducida por un estímulo sináptico (Harada *et al.*, 2016). Sin embargo, no existe evidencia que demuestre este fenómeno.



Figura 1. "Acción dual" de la activación de los R-GABA_A en CCs de rata. Esquema los efectos de la estimulación eléctrica y de la aplicación de GABA (30μ M) en las CCs a través del un registro de la fluorescencia de fluo-4 en la médula adrenal. **a)** Representación de una CC con R-GABA_A **b)** una CC sin R-GABA_A; ambas CCs reciben inervación colinérgica del nervio esplácnico. En **c** y **d** se muestran los valores del cambio en unidades arbitrarias (u.a.) de la fluorescencia en el tiempo que aparentemente se produce en las células a y b, respectivamente. En ambos casos, un tren de estímulos eléctricos de 60 V con 1.5 ms de duración a 10 Hz durante 30 s, incrementa la intensidad de fluorescencia hasta ~0.4 u.a.; el periodo de estímulación está indicado por la línea punteada en color naranja en la parte inferior de los trazos. Posteriormente, la aplicación de GABA en c, indujo un incremento de la fluorescencia, esto ayudó a determinar la presencia de R-GABA_A en la CC representada en a. En cambio, la CC que no presentó un incremento de fluorescencia en respuesta a GABA (d), fue determinada como una CC sin R-GABA_A (b). Posteriormente, al aplicar GABA mientras se estimuló eléctricamente, se observó que la respuesta de las células a la estimulación eléctrica disminuyó solo en la célula con R-GABA_A (la célula que incrementó su fluorescencia al aplicar GABA, como se muestra en c). Esquema basado en los datos de Matsuoka *et al.*, 2008.

La mayoría de los trabajos antes mencionados, se han realizado en CCs disociadas y mantenidas en cultivo. Estos trabajos, se enfocaron, principalmente, en

analizar las respuestas que corresponden a una tercera parte de las CCs de toda la médula adrenal, que son las CCs que se despolarizan al activar R-GABA_A. De alguna manera, estos resultados han sesgado la interpretación de los resultados de experimentos realizados *in situ* o en tejido intacto y esto hace parecer sus interpretaciones fragmentarias y contradictorias. Por esa razón, el presente estudio está enfocado en aclarar la complejidad del papel de GABA en las CCs. Esto se realizará a través del análisis de la modulación autócrina y parácrina del GABA en el tejido adrenal intacto (rebanada de glándula adrenal) con una resolución de célula única, de ese modo podríamos reconocer **cuál es la participación del GABA en la función de las CCs**. En este sentido, es muy posible que el **GABA endógeno** (GABA liberado de las CCs, que por efecto del tipo de preparación creemos que se conserva en el microambiente celular y mantiene activos a los R-GABA_A) tenga efectos de mayor impacto fisiológico en la función de la médula adrenal de los que se predicen por estudios en células disociadas y a la vez podríamos explicar los mecanismos de los fenómenos que fueron observados en los experimentos que se han realizado *in situ* y en tejido intacto.

Pregunta General

¿Cuál es la participación del GABA en la función de las células cromafines?

- a) ¿Qué efecto tiene la activación de los receptores GABA_A sobre las células cromafines en la rebana de glándula adrenal?
- b) ¿Cuál es el mecanismo por el cual el GABA reduce las señales de calcio estimuladas sinápticamente por el nervio esplácnico en las células cromafines?

Hipótesis

- a) La activación del receptor GABA_A en las células cromafines produce una despolarización, que depende del E_{CI}, la cual incrementa la concentración de Ca²⁺i e induce la exocitosis de catecolaminas.
- b) El GABA endógeno actúa sobre los receptores GABA_A pre-sinápticos (en el nervio esplácnico) disminuyendo la liberación de acetilcolina y, por tanto, impide la activación de las células cromafines.

Objetivo general

Identificar el papel del GABA en las células cromafines a través de la medición de los eventos relacionados con la secreción de catecolaminas: las señales de Ca²⁺, y el potencial de membrana.

Objetivos Particulares

- Evaluar el efecto de la activación de los receptores GABA_A mediante muscimol en la concentración de Ca²⁺_i y potencial de membrana en las células cromafines.
- Identificar a los co-transportadores catión/anión responsables de la acumulación de Cl⁻i en las células cromafines.

• Caracterizar las acciones del GABA endógeno en la actividad basal de las células cromafines al determinar su acción en las señales de Ca²⁺_i y el potencial de membrana.

• Evaluar si el GABA endógeno modula la transmisión sináptica mediada por el nervio esplácnico, ya sea por la activación de receptores GABA_A en las células cromafines (post-sinapsis) y/o directamente en las terminales sinápticas (pre-sinapsis).

Los animales utilizados en este trabajo fueron obtenidos de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde fueron mantenidos bajo el protocolo para uso y cuidado de animales de laboratorio de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y al protocolo CICUAL-IFC # AHC24-141. Las ratas utilizadas para el proceso experimental se mantuvieron con alimentación y agua *ad libitum*, a temperatura constante y bajo un ciclo de 12 h luz / 12 h obscuridad.

Obtención de rebanadas de glándula adrenal

Se utilizaron rebanadas de las glándulas adrenales de ratas Wistar macho de 8 semanas de edad. Como se ha descrito previamente (Hernández et al., 2011) los animales se anestesiaron mediante una invección intraperitoneal de pentobarbital sódico (0.1 ml/250 g) inmediatamente ambas glándulas adrenales fueron removidas y sumergidas en solución salina que contenía en mM: 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ y 10 glucosa, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂, para mantener el pH = 7.4, a una temperatura de 8° C. En seguida se retiró el exceso de grasa de ambas glándulas; posteriormente se preparó agar al 3 % diluido en solución salina y se llevó a 100° C, después se dejó enfriar y una vez que alcanzó una temperatura aproximada de 35° C las glándulas se embebieron dentro del agar, una vez con el tejido adrenal incorporado, el agar se solidificó en refrigeración. Una vez solidificado, los bloques de agar fueron recortados en cubos de aprox. 5 mm por lado, estos se posicionaron y fijaron a un soporte móvil de un vibratomo (Leica VT1000S), para luego ser cubiertas con la solución salina a punto de congelación. Las rebanadas se obtuvieron mediante cortes de 200 µm de grosor, las cuales se colectaron y mantuvieron en la solución salina, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂ a 23 °C, bajo estas condiciones las rebanadas se mantienen viables durante un lapso de hasta 6 h después de la preparación.

Registro de señales de Ca²⁺i en CCs de rebanadas de glándula adrenal

Para los registros del Ca²⁺_i, las rebanadas adrenales se incubaron en condiciones de oscuridad durante 35 min., en una solución salina en presencia 10 μ M del indicador sensible a calcio Fluo-4 AM (Invitrogen, Life Sciences, California) y 0.5 % de ácido plurónico F-127 (Sigma, St Luis MO) en una atmósfera saturada con 95 % O₂ y 5 % CO₂. Después de la incubación las rebanadas se lavaron con solución salina y se montaron sobre el fondo de una cámara de registro sobre la platina de un microscopio vertical de epifluorescencia (Nikon Eclipse 80i, Nueva York) equipado con un objetivo 20x (apertura numérica 0.5) de inmersión en agua. Las rebanadas se mantuvieron bajo perfusión continua de solución salina saturada con 95 % O₂ y 5 % CO₂ (2 ml/min) a una temperatura de 23°C, durante todo el registro.

La excitación del fluoróforo se realizó a 488 nm mediante un sistema que se compone de una lámpara de Xenón adaptada a un monocromador Polychrome V (Till Photonics) conectado por medio de una fibra óptica al microscopio. La fluorescencia emitida fue seleccionada al pasar por una serie de filtros de emisión (540 nm) Nikon B-2E/C. Las imágenes con un campo de registro de 800 X 600 µm, fueron adquiridas con una cámara CCD (charge-coupled device; IMAGO-QE, TILL Photonics) a 3 cuadros/segundo con una exposición de 15 ms por imagen, estos protocolos fueron escritos en el software TILLVISION 4.0. De esta forma se adquirieron secuencias de imágenes cortas (películas) de 540 imágenes en 180 s, con intervalos de 2 a 3 min entre cada secuencia, con un tiempo de registro total de 20 a 30 min.

Al final de cada experimento, se perfundió a la rebanada con una solución con alta concentración de K⁺ (50 mM) que contiene en mM: 50 KCl, 120 NaCl, 10 Hepes-Na y 2 de CaCl₂ a un pH 7.4, lo cual indujo una despolarización de las CCs y, por lo tanto, la entrada de Ca²⁺ a través de canales de calcio activados por voltaje, a partir de esto se determinó el número total de células viables, tanto silentes como activas en el registro que incorporaron el fluo-4 AM.

15

Para los experimentos donde se incuba a las rebanadas adrenales en una solución con baja concentración de Cl⁻ extracelular, en la solución se sustituyeron los 125 mM de NaCl por 125 mM de ácido isetiónico (sal de sodio) y los 2.5 mM de KCl fueron substituidos por 2.5 mM de ácido D-glucónico (sal de potasio). La solución final fue en mM: 125 ácido isetiónico (sal de sodio), 2.5 ácido D-glucónico (sal de potasio), 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ y 10 glucosa, saturada con 95% O₂ y 5% CO₂, para mantener el pH = 7.4

Análisis de Imágenes

Las secuencias de imágenes fueron guardadas en un formato multi-tiff y analizadas con Image J 1.38 macros (National Institutes of Health; <u>https://imagej.nih.gov/</u>). La fluorescencia de Fluo-4 presente está en función de la concentración del colorante, la fuente de iluminación y de la concentración de Ca²⁺_i. En este trabajo solo se tomaron en cuenta los cambios en la fluorescencia relacionados a la concentración de Ca²⁺_i. Las películas se convirtieron ΔF : $\Delta F = F_i - F_0$, donde F_0 es la imagen promedio de la intensidad mínima de las 540 imágenes de la secuencia y F_i representa cada imagen de la secuencia (i). Los valores ΔF son expresados como unidades arbitrarias (u.a.).

El análisis de las células individuales se realizó en las secuencias de imágenes Δ F. Los valores de la intensidad de fluorescencia de cada célula, se obtuvieron por medio de la selección de las áreas de interés, correspondientes a las células que presentaron un incremento en la intensidad de fluorescencia por la adición de una solución con K⁺ alto. Esta selección de áreas se usó para localizar los cambios en la intensidad de fluorescencia de cada una de las áreas de interés, en todas las secuencias de imágenes que correspondieran al mismo registro (control, tratamientos, lavado y K⁺ alto).

Los datos de la intensidad de fluorescencia de cada área obtenida se colocaron en una gráfica tipo raster $\Delta F_{(t)}$, mediante un programa en Igor Pro 5.03 (Wavemetrics Inc, Oregón) escrito por el Dr. León Islas de la Facultad de Medicina de la UNAM. Una vez que se obtuvo el número total de CCs que respondieron en el campo, se calcularon los porcentajes de CCs espontáneamente activas e inactivas. Las células se consideraron "espontáneamente activas" o "con capacidad de responder" cuando ΔF aumentó o disminuyó más de dos veces

16



la desviación estándar del ruido (Figura 2a).

Figura 2. Análisis de imágenes de Ca²⁺_i en las CCs. a) Imagen obtenida en la región central de la médula adrenal durante el pico de despolarización y entrada de Ca²⁺ inducida por la adición de la solución con K⁺ alto (50 mM). Los círculos amarillos que indican las áreas de interés, fueron colocados sobre cada célula que presentó un incrementó de fluorescencia >5 a.u. (unidades arbitrarias). Posteriormente las áreas de interés fueron repetidas en cada imagen ΔF (F_i-F₀) para obtener el gráfico tipo raster ($\Delta F(t)$ de cada célula, sobre los valores de tiempo). b) La adición de la solución con K⁺ alto en las 20 áreas de interés (indicadas con números) que fueron seleccionadas en a. Los cambios en la fluorescencia (ΔF) están representados con la escala de pseudo-color de la barra que se encuentra a la derecha. c) Imágenes consecutivas de la célula señalada con una flecha blanca en a. Se muestra una célula, antes, durante y después de la aplicación de K⁺ alto. La despolarización inducida por el K⁺ alto induce un transitorio de Ca²⁺_i que se muestra arriba de las secuencias de imágenes, es el $\Delta F(t)$ del área de interés (célula) indicada con el círculo amarillo (Alejandre-García *et al.*, 2016).

Estimulación eléctrica

La estimulación colinérgica de las CCs se consiguió estimulando las fibras del nervio esplácnico con un electrodo bipolar concéntrico (50 µm en la punta; FHC Inc., Maine). Para llevar acabo esto, las rebanadas adrenales se cortaron de modo que el sitio por donde entran las fibras nerviosas y las fibras mismas, se mantuvieran lo más intactas posible. Se seleccionaron las rebanadas donde las fibras nerviosas se observaban mejor, esto se consiguió con ayuda de un microscopio de luz a un aumento de 40 X, las fibras se detectan fácilmente, ya que al a travesar la corteza adrenal, tienen un diámetro de ~50 µm, además,

la zona de la corteza adrenal por donde pasa el nervio esplácnico es menos densa y también es más clara que el resto de la corteza. Posteriormente, las rebanadas se colocaron sobre la platina del microscopio de epifluorescencia con perfusión constante, donde se adapto un electrodo de estimulación. El electrodo de estimulación se colocó sobre las fibras nerviosas que pasan por la corteza adrenal (como se muestra en la Figura 3) y el registro y el análisis de la epifluorescencia se realizó como esta indicado en los métodos antes mencionados, en la zona que corresponde a la médula adrenal. La distancia entre el sitio de registro y el electrodo de estimulación siempre fue mayor a 500 µm. La frecuencia del estímulo fue controlada por un programa personalizado (escrito por el Dr. Jesús Peréz) en una placa de desarrollo de hardware (tarjeta de Arduino) que controlaba un estimulador de voltaje constante (DS2A, Digitimer, Hertfordshire). Se aplicaron trenes de pulsos de voltaje de 10 ms de duración durante 2 s a 10 Hz en las fibras nerviosas (con incrementos graduales en el rango de 10 a 30 Volts, hasta observar un incremento transitorio de la concentración de Ca²⁺i en las CCs. Para corroborar que los incremento en la concentración de Ca²⁺i que inducia el estímulo no era un artefacto debido a la estimulación directa de las CCs, se realizaron controles como: a) se colocó el electrodo en diferentes posiciones sobre la corteza donde no se encontraba el nervio, se estimuló eléctricamente en esas posiciones y se registró, pero no se observó a ninguna CC activarse; b) por otro lado, durante la estimulación de las fibras nerviosas, se aplicó mecamilamina (antagonistas de los R-GABAA) 10 μ M, las señales de Ca²⁺_i inducidas por la estimulación eléctrica disminuyeron su amplitud, con esto se comprobó que el incremento en la concentración de Ca²⁺i era inducido por estimulación colinérgica.



Figura 3. Estimulación eléctrica del nervio esplácnico en la rebanada de glándula adrenal. Las rebanadas de glándula adrenal, se colocaron sobre la platina del microscopio de epifluorescencia con perfusión constante, la platina del microscopio tenía adaptado un electrodo de estimulación bipolar concéntrico de 50 μ m. El electrodo de estimulación se colocó sobre las fibras nerviosas que pasan por la corteza adrenal (C), y el registro de epifluorescencia se realizó en la parte correspondiente a la médula (M). La distancia entre el sitio de registro y el electrodo de estimulación siempre fue mayor a 500 μ m.

Registro electrofisiológico

a) Potencial de membrana

Para evaluar si la activación de los R-GABA_A o la acumulación del GABA endógeno afectaba el potencial de reposo y la generación y frecuencia de potenciales de acción en las CCs, se realizaron los registros electrofisiológicos usando la técnica de fijación de voltaje (*patch-clamp*) en la configuración de parche perforado.

Las rebanadas adrenales se colocaron en una cámara de registro ubicada en la platina de un microscopio vertical (Eclipse FNI, Nikon, Tokyo). La imagen de las rebanadas fue enviada a un monitor mediante una cámara CCD conectada al microscopio, los registros se realizaron observando la muestra con un objetivo 40x. La rebanada en registro se mantuvo con perfusión constante de 2 ml/min de solución salina.

Las pipetas de registro utilizadas se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato (World Precisión Instruments, Florida) y fueron fabricados mediante un estirador de capilares a base de calor modelo P-97 (Sutter Instruments, California). Las pipetas tenían una

resistencia entre 6 - 8 M Ω cuando se llenaban con una solución que contenía en mM: 130 KCl, 5 Hepes, 2 MgCl₂, 1.1 EGTA, pH 7.3. A esta solución se le agregaron 50-100 ng/ml de gramicidina (ThermoFisher), como agente perforante, disuelta en Dimetil sulfoxido (DMSO; Sigma, St. Louis Misuri). Los registros se llevaron a cabo en la modalidad de parche perforado (Kyrozis y Reichling, 1995) en fijación de corriente. Para facilitar el sellado de la membrana, la punta de la pipeta se sumergió brevemente en una solución sin gramicidina y luego la pipeta se rellenó con la solución con gramicidina. Posteriormente, con la ayuda de un micromanipulador MPC-200 (Sutter Instruments, California), la pipeta se puso en contacto con la célula a registrar. Los registros electrofisiológicos comenzaron cuando la resistencia de las pipetas era menor a 20 M Ω (Rae *et al.*, 1991), se eliminaron cuando la corriente de fuga fue mayor a 25 pA o la resistencia del sello era menor a 1 G Ω . Se almacenaron todos los datos, el potencial de membrana en reposo con 0 pA de inyección y también la corriente inyectada cuando era necesario mantener a la célula en su potencial de reposo ~ -60 mV. La estimulación y adquisición de los datos (frecuencia de adquisición 10 kHz; filtrados a 1 kHz) se realizó con un amplificador EPC-10 en el programa PatchMaster (HEKA Electronic, Lambrecht) y se almacenaron en una computadora Macintosh G4.

b) Registro de Corrientes Post-sinápticas Excitadoras

Los experimentos fueron realizados CCs de rebanadas de glándula adrenal de rata, en la configuración de célula completa (*whole-cell*) en fijación de voltaje. La pipeta se rellenó con una solución compuesta por (en mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 20 TEACl, 5 ATP Mg, 1.1 EGTA, 5 HEPES, 2 MgCl₂, pH 7.2 ajustado con CsOH. Esta solución bloquea canales de K⁺, el potencial de membrana se mantuvo en -80 mV para registrar corrientes post-sinápticas exitadoras (EPSCs).

c) Registro de las post-hiperpolarizaciones (PHP) de los potenciales de acción

Los experimentos fueron realizados en las CCs en rebanada, en la configuración de célula completa en fijación de corriente. La pipeta de registro tenía una resistencia de 4-5 M Ω y se rellenó con una solución compuesta por (en mM): 140 gluconato de K⁺, 2 MgCl₂, 1.1

EGTA, 5 HEPES, el pH 7.2 fue ajustado con KOH. Los registros fueron realizados con la técnica de *patch-clamp* en parche perforado (Rae *et al.*, 1991) usando una solución que contenía 50–100 ng/ml de anfotericina B (Sigma; St. Louis, MO). La anfotericina B se disolvió en DMSO (Sigma, St. Louis, MO) y fue almacenada a –20 °C en alicuotas (50 µg/ml). Una vez en la configuración de parche perforado, se cambió al modo de fijación de corriente y los cambios en el potencial de membrana fueron registrados. Si era necesario, se inyectaba una pequeña corriente hiperpolarizante para mantener el potencial de membrana en ~-60 mV. Solo se provocaba un potencial de acción por medio de la inyección breve de pasos de corriente despolarizante (7 ms; 10–20 pA). El análisis de los datos electrofisiológicos se realizó con clampfit (10.4.0.36, Molecular Devices, California).

Inmunofluorescencia

Las ratas macho Wistar fueron perfundidas con solución salina (NaCl a 0.9 %) a 4 °C y después con paraformaldehído (PFA 4 %) en buffer de fosfatos (0.1 M). Se extrajeron las glándulas adrenales y se dejaron en post-fijación por 48 h. A continuación, el tejido se deshidrató en gradientes de sacarosa (10, 20, 30 % durante 24 h cada uno) para ser cortado en un criostato (40 μ m de grosor).

Las secciones fueron tratadas en flotación, se permeabilizaron con Triton (0.3%) en PB (buffer fosfatos) y se bloquearon por 2 h con BSA (albúmina de suero bovino) en PB-Tx (Buffer de fosfatos 0.1 M más Triton al 0.3%). Posteriormente, las rebanadas se incubaron por 48 h a 4° C con los anticuerpos primarios descritos en la siguiente tabla:

Anticuerpo primario	Especie	Compañía	# de catalogo	Concentración
anti-NKCC1	Conejo	Abcam	ab59791	1:200
anti-KCC2	Conejo	Millipore	07-432	1:200
SMI-32	Ratón	Covance		1:1000
Sinaptofisina (SYP)	Conejo	Santa Cruz	H-93	1:500

Tabla 1. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados.

Después del periodo con los anticuerpos primarios, se realizaron tres lavados (10 min cada uno) con PB-Tx. Posteriormente, las inmunos que se realizaron con anticuerpos hechos en conejo se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con FITC (fluoresceína Isotiocianato; Jackson Lab) anti-conejo hecho en cabra (1:200), para el anticuerpo primario SMI-32 se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con Texas Red (Vector Laboratories) anti-ratón hecho en caballo (1:500) ambos anticuerpos secundarios fueron diluidos en PB-Tx, por 2 h a temperatura ambiente. Terminada la incubación de los secundarios se realizaron tres lavados y se montaron utilizando el medio de montaje VectaShield con DAPI (4, 6 diamino-2-phenylindole). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio Olympus Fluoview-FV10i.

Registros amperométricos de la liberación de catecolaminas

Los microelectrodos fueron hechos como en (Gil *et al.*, 1998). Una fibra de carbón de 10 μ m de diámetro fue aislada con polipropileno y conectada por medio de mercurio a la cabeza de un amplificador. Los electrodos fueron calibrados al exponer la punta a 50 μ M de noradrenalina mientras se mantenía al electrodo en un potencial de +700 mV (Miranda-Ferreira *et al.*, 2010). Los electrodos que no mostraron sensibilidad a la noradrenalina (corriente menor a 200 pA), fueron descartados.

Para monitorear la liberación de catecolaminas, las rebanadas de glándula adrenal de rata fueron colocadas en la platina de un microscopio vertical (Eclipse FNI, Nikon, Tokyo). La imagen de las rebanadas fue enviada a un monitor mediante una cámara CCD conectada al microscopio, los registros se realizaron observando la muestra con un objetivo 40x. La rebanada en registro se mantuvo con perfusión constante de 2 ml/min de solución salina. El microelectrodo fue colocado en una posición cercana a la superficie de una célula con un micromanipulador de alta precisión (MPC-200). La punta del electrodo fue mantenida en un potencial de +700 mV. Los registros fueron realizados en el amplificador EPC-10 en un modo de fijación de voltaje en el software PatchMaster (HEKA Electronic). Los datos de corriente fueron adquiridos a 4 kHz y filtrados en 400 Hz (Segura-Chama *et al.*, 2015).

Los experimentos se realizaron en CCs en reposo para registrar la liberación espontánea de catecolaminas, lo cual, es un proceso fisiológico normal (Akiyama *et al.*, 2010; Malgaroli y Meldolesi, 1991). Posteriormente, se aplicó muscimol (20 μ M), picrotoxina (100 μ M) o una solución con K⁺ alto (20 mM). Las soluciones fueron aplicadas a través una perfusión continua (2 ml/min) y las rebanadas se mantuvieron a una temperatura de 23°C, durante

22

todo el registro.

Fármacos

Las soluciones utilizadas fueron preparadas antes de cada experimento y añadidas a través de un sistema de perfusión estandarizado de tal modo que los fármacos se mantuvieran en la cámara de registro (donde se colocó el tejido) en el tiempo requerido y en la concentración preparada. Los fármacos utilizados fueron: muscimol (agonista de R-GABA_A); bicuculina, bicuculina-metiodida (Bic-Met), gabazina y picrotoxina (antagonistas de R-GABA_A). Bumetanida (Inhibidor de los co-transportadores NKCC1) y triclormetiazida (inhibidor de los co-transportadores de Na⁺/Cl⁻ o del intercambiador Bicarbonato/Cl⁻). Nicotina bitartrate y mecamilamina, agonista y antagonista de receptores nicotínicos respectivamente (Sigma, St. Louis Misuri).

Análisis estadísticos

Los datos se expresan como media \pm E.E. donde fue utilizada la prueba pareada de t de Student para determinar la significancia estadística entre medias o fue expresada en medianas con rango intercuartil (IQR) donde se aplicó la prueba no pareada de rango Wilcoxon. La significancia estadística se estableció en p <0.05.

Resultados

Efecto de la activación de los R-GABA_A por muscimol en la concentración de Ca²⁺_i y potencial de membrana en las CCs

Para poder evaluar el efecto de la activación de los R-GABA_A mediante muscimol en la concentración de Ca²⁺_i y potencial de membrana en las CCs, se registro la actividad basal durante de las CCs durante tres minutos y después se agregó muscimol, un agonista del R-GABA_A (20 μ M, 25 s), lo cual produjo la elevación de la concentración de Ca²⁺_i en un subconjunto de CCs. Posteriormente, la actividad basal se registró de nuevo y finalmente se aplicó una solución con K⁺ alto (25 s) lo cual provocó el aumento de la concentración de Ca²⁺_i.

Entre la población de CCs, los incrementos transitorios y espontáneos de la concentración de Ca²⁺_i ocurre con una variación considerable en frecuencia y amplitud. La gráfica tipo raster $\Delta F(t)$ (eje x) de cada célula (eje y) en la Figura 4a, resume la actividad registrada en una rebanada adrenal representativa. El 100% de las CCs en una rebanada, representa a todas las células que mostraron un incremento en el ΔF de dos veces la desviación estándar del valor del ruido en respuesta a la solución salina con K⁺ alto, en el campo de registro.

Lo que se observó fue que $53 \pm 4\%$ de las CCs mostraron transitorios espontáneos de Ca²⁺_i, mientras que el 47 ± 4% de ellas estuvieron inactivas o "silentes". La proporción de CCs activas versus silentes es consistente con reportes previos en CCs de rata *in vitro* (Busik *et al.*, 1996; D'Andrea *et al.*, 1994).

La Figura 4e ejemplifica los patrones de las señales de Ca^{2+}_i que se presentan con mayor frecuencia en una rebanada. Estos patrones son las diferentes respuestas a muscimol, los porcentajes de estos patrones están promediados con los de otras rebanadas (n=5 rebanadas, cada rebanada se obtuvo de una rata diferente). Se observó que muscimol, no solo incrementó la concentración de Ca^{2+}_i en 44 ± 3% (media ± EE) de las CCs, si no que el 26 ± 2% de las CCs mostró un pequeño decremento y el resto (30 ± 5%) fueron CCs que no

Resultados

modificaron su Ca²⁺_i en presencia de muscimol. Se ha reportado que la aplicación de GABA o muscimol en CCs en cultivo durante 5-8 min, produce un breve aumento transitorio de Ca²⁺_i y después inhibe toda actividad (Busik *et al.*, 1996). Este efecto no se observó en nuestros resultados. Sin embargo, aquí, la aplicación de muscimol, fue breve (25 s) y además la concentración que usamos fue mucho menor (20 vs. 100 μ M).


Figura 4. Efecto de la activación de los R-GABA_A por su agonista específico, muscimol en las CCs. a) La Gráfica tipo raster muestra la actividad de 228 CCs de una rebanada de glándula adrenal. Esta gráfica recapitula 4 episodios: primer episodio: control, actividad basal y transitorios espontáneos de Ca²⁺, segundo episodio: cambio en la concentración de Ca²⁺, inducida por la aplicación de muscimol (20 µM; 25 s), tercer episodio: el lavado de muscimol, y cuarto episodio: el incremento en la concentración de Ca²⁺, inducida por la aplicación de K⁺ alto (25 s). Solo las células que respondieron a la aplicación de K⁺ alto con un incremento transitorio de Ca²⁺_i (población total de CCs viables), fueron incluidas en el análisis. b) Registros obtenidos de tres CCs representativas de los principales patrones de las señales de Ca^{2+} observadas. Primer trazo: una CC que responde a muscimol con un aumento en la concentración de Ca²⁺_i. Segundo trazo: una CC no responsiva a la aplicación de muscimol. Tercer trazo: una CC que responde a muscimol con un pequeño decremento en su concentración de Ca²⁺_i. Los porcentajes obtenidos para cada patrón observado es mostrado a la derecha (n = 5 rebanadas). c) Respuestas divergentes en el Vm en respuesta a la aplicación de muscimol en las CCs. Registros de fijación de corriente en la configuración de parche perforado para lo cual se usó gramicidina como agente perforante, la cual fue usada para evitar cambios en la concentración de Cl_i. Trazos obtenidos de tres CCs individuales de los principales de patrones observados en el Vm; primer trazo: una CC que responde a muscimol con una despolarización y un incremento en la frecuencia de sus potenciales de acción. Segundo trazo: ejemplo de una CC donde muscimol hiperpolariza el Vm y detiene la generación de potenciales de acción. Tercer trazo: es una CC que no modificó su Vm cuando se aplicó muscimol. d) Los trazos de la derecha muestran las respuestas a muscimol con la escala de voltaje expandida x5 de la región punteada en c. e) Muscimol despolariza 10 de 20 CCs (trazos rojos), 5 de 20 CCs son hiperpolarizadas (trazos azules) y las 5 CCs restantes no muestran ningún cambio (trazos grises) (n=20 células; se registró una célula por rebanada; 20 rebanadas provenientes de 10 ratas). f) El cambio en el voltaje de membrana inducido por muscimol fue de 12 ± 2 mV en las CCs que se despolarizaron (puntos rojos) y de -6.5 ± 1.0 mV en las CCs que se hiperpolarizaron (puntos azules) g) La despolarización inducida por muscimol incrementó la frecuencia de generación de los potenciales de acción en 0.6 ± 0.2 Hz y la hiperpolarización decrementó la frecuencia 0.20 ± 0.04 Hz.

Respecto al grupo de CCs que no mostró ningún cambio durante la aplicación de muscimol, pensamos que se debe a un déficit de expresión de R-GABA_A. Otra alternativa para explicar esta falta de efecto sería que el voltaje de membrana (Vm) y el E_{CI} pueden ser muy similares, por lo tanto, la activación de los R-GABA_A no provoca flujo neto de Cl⁻, ni cambia el Vm.

La disminución en la concentración de Ca^{2+}_i que induce muscimol, no había sido reportada antes en las CCs. Para explicar este resultado propusimos que en ese porcentaje de CCs (Alejandre-García *et al.*, 2016; Irwin y Allen, 2009), el E_{CI} debía ser más negativo que el Vm y, por lo tanto, la activación de los R-GABA_A hiperpolarizan el Vm, esto disminuiría también la generación de potenciales de acción y reduciría el flujo de Ca²⁺ probablemente al reducir

la probabilidad de apertura de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje. Los registros electrofisiológicos confirmaron esta interpretación: muscimol despolarizó el Vm 12 ± 2 mV e incrementó la frecuencia de generación de los potenciales de acción 0.6 ± 0.2 Hz (10 de 20 células), en otro grupo de células muscimol las hiperpolarizó 6.6 ± 1 mV (5 de 20 células) y detuvo la generación de potenciales de acción 0.2 ± 0.04 Hz. En las 5 células restantes muscimol no produjo ninguna respuesta evidente (Figura 4c).

Los resultados de este experimento, pueden ser comparados con lo que se ha observado en neuronas inmaduras del sistema nervioso central, donde la estimulación de los R-GABA_A es excitadora. Y posteriormente, durante el desarrollo, el efecto de la activación del R-GABA_A cambia a inhibitorio en neuronas maduras. Esto se debe a los cambios de positivo a negativo del E_{CI} respecto al Vm, debido a una mayor expresión de co-transportadores NKCC1 (Na⁺/K⁺/2Cl⁻) en las células inmaduras lo que permite un mayor flujo de Cl⁻ al medio intracelular. Y a la sobre expresión de co-transportador KCC2 (K⁺/Cl⁻) en neuronas maduras (Ben-Ari *et al.*, 2007), que induce el flujo de Cl⁻ al medio extracelular.

Cabe mencionar que a pesar de que las CCs tengan diferentes respuestas a muscimol, por ejemplo: despolarización o hiperpolarización no se ha encontrado que eso determine o influya en algún patrón de su actividad de Ca²⁺_i, esto quiere decir que no importa si una célula tiene más actividad espontánea o es una célula silente, eso no determinará su respuesta a muscimol. Estos resultados sugieren que la actividad espontanea de Ca²⁺_i es homogénea entre los diferentes grupos de CCs que se formaron con referencia a su respuesta a muscimol (Alejandre-García, 2014 -Tesis de Maestría).

Las señales de Ca²⁺_i inducidas por activación del R-GABA_A en las CCs depende de la presencia de Ca²⁺ extracelular

En las CCs en cultivo, la activación de los R-GABA_A, produce un aumento en la concentración de Ca²⁺_i lo cual requiere de Ca²⁺ externo. Este aumento de Ca²⁺ se inhibió con nifedipina (un bloqueador de canales de calcio sensibles a dihidropiridinas), lo cual implica la participación de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje tipo-L (Kitayama *et al.*, 1990).

27

Para corroborar que las señales de Ca²⁺_i inducidas por la estimulación del R-GABA_A en las CCs en rebanada dependen de la presencia de Ca²⁺ extracelular, se aplicó el agonista de GABA_A en presencia de una solución salina libre de Ca²⁺. Para esto, se sustituyó equimolarmente el CaCl₂ (2 mM) por MgCl₂ (2 mM) en la solución salina para mantener las condiciones iónicas y la osmolaridad de la solución, además se agregaron 5 mM de EGTA como agente quelante del Ca²⁺ para asegurar que no hubiera Ca²⁺ remanente en la rebanada.

La Figura 5a resume este experimento: primero se registró la actividad basal y después se aplicó muscimol (20 μ M; 25 s) produciendo un aumento de la concentración de Ca²⁺_i en 43 ± 2 % de las CCs y un decremento en el 23 ± 4 %. Las CCs restantes 35 ± 6 % no respondieron (n=5 rebanadas adrenales de 5 ratas diferentes). En presencia de una solución salina libre de Ca²⁺, muscimol fue incapaz de inducir el aumento de la concentración de Ca²⁺_i y los transitorios de Ca²⁺_i, que estaban presentes en 53 ± 5 % de las CCs, cesaron completamente. Cuando la solución salina con la concentración de Ca²⁺ normal fue reestablecida, los transitorios de Ca²⁺ reaparecieron, esto sugirió la necesidad de la presencia de Ca²⁺ externo (D'Andrea *et al.*, 1993).

La Figura 5b ejemplifica el registro obtenido de una CC que tiene transitorios espontáneos de Ca²⁺_i; el aumento en la concentración de Ca²⁺_i inducido por muscimol fue extinguido durante la aplicación de la solución libre de Ca²⁺, así como los transitorios de Ca²⁺_i, mismos que se reestablecieron con la perfusión de la solución con Ca²⁺ normal. Con esto se observó que el incremento de la concentración de Ca²⁺_i inducido por la activación de R-GABA_A, depende del Ca²⁺ extracelular que fluye a través de canales de calcio activados por voltaje (Alejandre García *et al.*, 2016).



Figura 5. El aumento en la concentración de Ca^{2+}_i inducido por muscimol requiere de Ca^{2+} extracelular. a) En gráfica tipo raster representa la actividad de 201 CCs de una rebanada de glándula adrenal, donde se registró la actividad espontánea de las CCs y después se aplicó muscimol (20 µM; 25 s; línea roja), posteriormente se realizó un lavado de 3 min y durante el tiempo indicado con la línea gris, se perfundió la rebanada con una solución libre de Ca²⁺ (5 min); en ausencia de Ca²⁺ externo se re-aplicó muscimol, no se observó ningún aumento de la concentración de Ca²⁺_i y los transitorios de Ca²⁺_i también fueron suprimidos. Después de 10 minutos de lavado con solución con Ca²⁺ normal, los transitorios de Ca²⁺_i reaparecieron. Finalmente se aplicó una solución con K⁺ alto como control de viabilidad. b) El trazo corresponde a una CC con actividad espontánea, donde la ausencia de Ca²⁺_i inducidas por muscimol. Los transitorio de Ca²⁺_i se recuperaron después del lavado con solución salina con Ca²⁺ normal (Alejandre García *et al.*, 2016).

Las señales de Ca²⁺_i inducidas por activación de los R-GABA_A en las CCs dependen de la presencia de Cl⁻ extracelular

La diversidad de los efectos inducidos por la activación de R-GABA_A en la concentración de Ca^{2+}_{i} y el Vm en la población de CCs de una rebanada adrenal (Alejandre García *et al.*, 2016), nos llevó a proponer que el E_{CI} entre las CCs es diferente. Los antecedentes descritos con anterioridad, nos permiten sugerir que las CCs que se despolarizan en presencia de muscimol, expresan co-transportadores NKCC1, recordemos que este transportador mueve Cl⁻ del medio extracelular al interior de la célula ayudado por los gradientes de Na⁺ y K⁺. Esto mantendrá la concentración de Cl⁻_i elevada y el E_{CI} despolarizante (-28 mV) como se observó en las CCs de bovino (Xie *et al.*, 2003).

Si la concentración de Cl⁻_i disminuye (de ~25mM a ~7mM) en una CC con el E_{Cl} despolarizante (por ej: -28 mV), el E_{Cl} se hará más negativo y, por lo tanto, la activación de R-GABA_A no inducirá despolarización y la concentración de Ca²⁺_i tampoco aumentará (Ben-Ari *et al.*, 2007).

Para poder identificar si la acumulación de Cl⁻_i en las CCs con un E_{CL} despolarizante depende de la presencia de Cl⁻ extracelular, se realizaron experimentos en rebanadas de glándula adrenal, estas rebanadas se expusieron a una solución salina con baja concentración de Cl⁻ (Figura 6). Se observó que, en presencia de solución salina, las CCs incrementaron su concentración de Ca²⁺_i al aplicar muscimol en el baño. A continuación, la solución salina se cambió por solución la salina con baja concentración de Cl⁻ y la rebanada se mantuvo así durante 43 min. La aplicación de muscimol bajo estas condiciones no indujo incrementos en la concentración de Ca²⁺_i por muscimol, esto podría deberse a que con una baja concentración de Cl⁻ extracelular, el Cl⁻ escapa de las células y el co-transportador catión-cloruro en las CCs (posiblemente NKCC1), es incapaz de mantener elevada la concentración de Cl⁻_i (Alejandre-García *et al.*, 2018).



Figura 6. Efecto de la perfusión de una solución salina con bajo CI⁻ en las señales de Ca²⁺ inducidas por muscimol. a) Los experimentos consisten de un registro inicial, en condiciones control, de la actividad de 158 CCs individuales, después, se aplicó muscimol (20 μ M; 25 s). 40 CCs

respondieron con un incremento en su concentración de Ca^{2+}_{i} . Después la rebanada fue incubada por 34 min en una solución salina con bajo Cl⁻. En presencia de solución salina con bajo Cl⁻, muscimol fue re-aplicado y solo 7 de 40 CCs continuaron respondiendo con un incremento de la concentración de Ca^{2+}_{i} . Al final se aplicó alto K⁺ como control de viabilidad de las CCs. **b)** Ejemplo del registro de una CC donde la presencia de una solución salina con bajo Cl⁻ evitó las señales de Ca²⁺_i inducidas por muscimol (Alejandre-García *et al.*, 2018).

Los co-transportadores NKCC1 no parecen ser los responsables de mantener elevada la concentración de Cl⁻i en las CCs

En las CCs de bovino, el E_{CI} es bastante positivo (–28 mV) comparado con el potencial de reposo de las CCs (–60 mV). Se asume que el co-transportador NKCC1 juega un papel en la regulación de la concentración de Cl⁻i porque está altamente expresado en CCs de bovino. Además, bumetanida (un bloqueador de los co-transportadores NKCC1) inhibe la elevación de la concentración de Ca²⁺, inducida por muscimol en las CCs (Xie *et al.*, 2003). A pesar de que KCC2 no fue encontrado en la médula adrenal por Xie en el 2003, nuestras observaciones en las CCs que se hiperpolarizan en presencia de muscimol, nos llevan a proponer la posibilidad de que KCC2 esté presente en estas células y que sea el responsable de mantener la concentración de Cl⁻i baja, en las CCs de rata, como se ha observado que sucede en las neuronas maduras (Ben- Ari *et al.*, 2007)

Nuestra pregunta es si NKCC1 se encontrará en las CCs de rata y si podría ser responsable de mantener la concentración de Cl⁻i alta. Otra cuestión es si el transportador KCC2 estará presente en una subpoblación de CCs.

Para determinar si NKCC1 o KCC2 se expresan en las CCs de rata. Se realizaron inmunofluorescencias en rebanadas de tejido adrenal. Para ello se obtuvieron cortes de glándula adrenal de 40 µm de grosor, previamente fijadas, se incubaron por separado con los anticuerpos (anti-NKCC1 y anti-KCC2). Al examinar las muestras se pudo observar que DAPI marca los núcleos de las CCs en todos los casos (Figura 7a y b). Sin embargo, no se detectó la presencia de NKCC1 en las CCs. Solo se pudo observar la presencia de NKCC1 en algunas células de mayor tamaño, probablemente neuronas colinérgicas, en la médula adrenal (Figura 7a). Estos resultados sugieren que NKCC1 no se expresa en la membrana

de las CCs de rata. Por otra parte, KCC2 sí se detectó en la médula adrenal y además su distribución parece corresponder a la membrana de una población de CCs (Figura 7b). Este resultado indica que KCC2 se expresa en algunas CCs de rata y podría ser el responsable de mantener la concentración de Cl⁻i baja en las CCs donde muscimol indujo hiperpolarización, como se ejemplifica en la Figura 7d.

Si NKCC1 está en las CCs de rata y puede ser responsable de mantener elevada la concentración de Cl⁻_i, la inhibición de este transportador reduciría la cantidad de Cl⁻ que ingresa a la célula, el E_{Cl} se haría más negativo y entonces, la activación de los R-GABA_A no incrementaría la concentración de Ca²⁺_i.

Para explorar la posibilidad de que NKCC1 sea el co-transportador responsable de la acumulación de Cl⁻i, incubamos rebanadas adrenales en bumetanida, un inhibidor de NKCC1 (100 μM; durante 35 min a 7 h.). Esto fue con la finalidad de observar una posible modificación en la respuesta de las CCs a la co-aplicación de muscimol. Como se muestra en la Figura 7c, después de incubar a la rebanada adrenal con bumetanida, los incrementos de la concentración de Ca²⁺i inducidos por muscimol, permanecieron sin cambios aparentes (Figura 7d), en comparación con los efectos de muscimol en el Ca²⁺i durante el lavado de bumetanida. Estos resultados sugieren que NKCC1 no se expresa en las CCs o, al menos, no es el principal co-transportador catión-cloruro responsable de la acumulación intracelular de Cl⁻ en las CCs de rata (Kahle *et al.*, 2010).



Figura 7. Co-transportadores NKCC1 no se expresan en las CCs ni son responsables de la acumulación de CI_i en las CCs. a) Micrografías de secciones de rebanadas de la glándula adrenal. En la primera columna se observa que los núcleos de las CCs fueron marcados en azul con DAPI. En la segunda columna las células positivas a NKCC1 fueron marcadas en verde con FITC, la tercer columna corresponde a las imágenes sobrepuestas de las marcas de DAPI y FITC de la misma sección de la rebanada, ninguna CC fue positiva para NKCC1. b) Inmunofluorescencia contra DAPI y el co-transportador KCC2. En la primera columna se observa a los núcleos de las CCs marcados con DAPI. En la segunda columna las células positivas a KCC2 fueron marcadas en verde (FITC), la tercer columna corresponde a las imágenes sobrepuestas de las marca de DAPI y FITC, se observa que una subpoblación de CCs es positiva a KCC2. c) Previamente a la incubación con fluo-4, la rebanada adrenal se mantuvo por 1 h 40 min en una solución salina que contenía 100 μ M bumetanida (inhibidor de los trasportadores NKCC1). En la imagen se muestran las señales de Ca²⁺_i registradas de 300 CCs

33

individuales en una glándula adrenal. Esta gráfica recapitula 2 episodios: primer episodio: se registró la actividad basal en presencia de bumetanida, después se co-aplicó muscimol (20 μ M; 25 s) y se registraron los cambios en la concentración de Ca²⁺_i. Segundo episodio: Después del lavado de bumetanida por alrededor del minuto # 40, se reaplicó muscimol y finalmente se registraron las señales de Ca²⁺_i provocadas por la despolarización que induce la aplicación de K⁺ alto (25 s). 42% de las CCs responden a muscimol con un incremento en su concentración de Ca²⁺_i. **d**. El primer trazo es la señal de Ca²⁺_i de una CC que respondió a muscimol con un aumento en la concentración de Ca²⁺_i, en la cual bumetanida no inhibió el incremento de la concentración de Ca²⁺_i inducido por muscimol. El segundo trazo es un ejemplo de otra CC donde la aplicación de muscimol disminuyó transitoriamente la concentración de Ca²⁺_i (n=6 rebanadas obtenidas de 3 ratas diferentes) (Alejandre-García *et al.*, 2018).

Factores involucrados en las respuestas diversas de las CCs por activación del R-GABA_A

Hemos planteamos que las repuestas opuestas a la activación de R-GABA_A en las CCs, son debido a un E_{CI} más positivo en una población de CCs y más negativo en otras, en relación al Vm. Especialmente, dados nuestros anteriores resultados, el E_{CI} más positivo debe ser causado por la presencia de algún transportador de aniones diferente de NKCC1.

Se han reportado otros mecanismos que mantienen la concentración Cl⁻i elevada, aparte de NKCC1; tal es el caso de la bomba de Cl⁻ dependiente de ATP (Inoue *et al.*, 1991) o el intercambiador de aniones AE3, el cual es expresado en neuronas y normalmente acumula Cl⁻ por medio del intercambio de cloruro por bicarbonato (Cl⁻/HCO₃⁻), lo cual, mantiene elevada la concentración de Cl⁻i (Roos y Boron, 1981). De manera interesante, se ha reportado que un miembro de la familia SLC26A de intercambiadores Cl⁻/HCO3⁻, denominado **pendrina** (principalmente expresados en el riñón) se expresa en la médula adrenal. Un estudio reciente demostró que la supresión genética de la expresión de pendrina afecta la liberación de catecolaminas de las CCs (Lazo-Fernandez *et al.*, 2015).

Con el antecedente de la presencia y acción de Pendrina en las CCs de rata nos dimos a la tarea de explorar su posible participación en el mantenimiento de una concentración de Cl⁻ i elevada. Para eso utilizamos **Triclormetiazida**, el cual es antihipertensivo con efectos diuréticos que provoca la inhibición de la reabsorción de Cl⁻ en el riñón, ya sea por la inhibición de los co-transportadores de Na⁺/Cl⁻ (NCCs) o del intercambiador Cl⁻/HCO3⁻

(pendrina). Por lo tanto, triclormetiazida podría inhibir la entrada de Cl⁻ a las CCs y, de este modo, reducir los efectos inducidos por muscimol que conllevan a una despolarización y elevación de la concentración de Ca²⁺_i.



Figura 8. Triclormetiazida inhibe el aumento de la concentración de $Ca^{2+}{}_{i}$ inducido por muscimol. La rebanada adrenal se mantuvo en una solución salina que contenía 100 μ M de triclormetiazida desde una hora antes de su registro, incluidos los 35 min de su incubación con Fluo-4. a) En la imagen se muestran las señales de $Ca^{2+}{}_{i}$ registradas de 255 CCs individuales en la médula adrenal. Esta gráfica recapitula 2 episodios; primer episodio: se registró la actividad basal en presencia de triclormetiazida; después se co-aplicó muscimol (20 μ M; 25 s) y se registraron los cambios en la concentración de $Ca^{2+}{}_{i}$. Segundo episodio: después del lavado de triclormetiazida, por alrededor de 30 min, se re-aplicó muscimol y al final se registraron los transitorios de $Ca^{2+}{}_{i}$ provocados por la despolarización que induce la aplicación de K⁺ alto (25 s). 36 % ± 3 de las CCs

responden a muscimol con un incremento en la concentración de Ca²⁺i durante el primer episodio (en presencia de triclormetiazida) y posteriormente, después de los 30 min de lavado, 42 ± 2 % de las CCs en el mismo registro, responden a muscimol. b) Trazo de la señal de Ca^{2+}_{i} de una CC que respondió a muscimol con un incremento transitorio en su concentración de Ca²⁺_i, la respuesta de la CCs en presencia de triclormetiazida fue de menor magnitud que el transitorio de Ca²⁺_i inducido por muscimol 30 min después del lavado de la triclormetiazida c) Modelos de los posibles elementos involucrados en las respuestas distintas de las CCs de rata por la activación de los R-GABA_A. En el modelo se muestra que la acumulación de Cl_i depende de los trasportadores de cloruro Na⁺/Cl⁻ (NCC) o Cl⁻/HCO₃⁻ (Pendrina), la cual es expresada en las CCs (Lazo-Fernandez et al., 2015). Por lo tanto, se asume que estos transportadores pueden estar presentes en las CCs y ser los responsables de que GABA produzca una despolarización de la membrana y el aumento en la concentración de Ca²⁺_i en una parte de las CCs. El co-transportador KCC2, que expulsa cloruro de las células, también se ilustra como el posible responsable de la baja concentración de Cl⁻i y de la hiperpolarización y del decremento de la concentración de Ca²⁺_i en respuesta a la activación del R-GABA_A en las CC. La regulación reciproca de los trasportadores NCC o Pendrina y KCC2, podrían ser la razón de las diferencias en la concentración de Cl⁻i en las CCs de la médula adrenal de rata.

En la Figura 8a, se muestra que después de incubar rebanadas adrenales con triclormetiazida (100 μ M; de 1 a 3 h), los incrementos de la concentración de Ca²⁺i inducidos por muscimol se presentaron en 36 ± 3 % de las CCs con una intensidad de fluorescencia promedio de 1.5 ± 0.2 u.a. Después de 30 min del lavado de la triclormetiazida, el porcentaje de las CCs que respondieron a muscimol con un incremento en la concentración de Ca²⁺i se elevó (42 ± 2 %), así como el aumento de la señal de Ca²⁺i: 2.7 ± 0.3 u.a. (n=3 rebanadas; p<0.0001) (Figura 8b). Estos resultados nos permiten sugerir que el cotransportador NCC o el intercambiador pendrina, pueden ser responsables de la acumulación intracelular de Cl⁻ en las CCs donde la aplicación de muscimol incrementa la concentración de Ca²⁺i.

La activación tónica de los R-GABA_A por el GABA endógeno modula los transitorios espontáneos Ca²⁺i

Para confirmar que los cambios en la concentración de Ca²⁺i inducidos por muscimol son resultado de la activación selectiva de los R-GABA_A, el efecto de muscimol fue examinado en presencia y ausencia de bicuculina (un antagonista selectivo de los R-GABA_A). El tipo de bicuculina utilizada en este trabajo fue libre de base.

Resumiendo, el experimento de la Figura 9a: Primero, se registró la actividad basal y después se aplicó muscimol (20 μ M; 25 s). Muscimol provocó un incremento de la concentración de Ca²⁺_i en 44 ± 3 % de las CCs y disminuyó la concentración de Ca²⁺_i en 26 ± 2 % de ellas. Después del lavado de muscimol, muscimol fue re-aplicado en presencia de 50 μ M de bicuculina. Claramente bicuculina previene completamente el incremento en la concentración de Ca²⁺_i provocado por muscimol.

La Figura 9e muestra 10 registros $\Delta F(t)$ superpuestos de 10 CCs donde muscimol indujo un decremento de la concentración de Ca²⁺_i de 1.000 ± 0.007 (basal) a 0.340 ± 0.002. El decremento total fue de: $\Delta F = -0.66$ a.u.; p < 0.0001). Como se muestra en la Figura 9f, el decremento inducido por muscimol en la concentración de Ca²⁺_i también fue abolido por bicuculina, de 1.000 ± 0.005 (basal) a 0.900 ± 0.005; $\Delta F = -0.0$ a. u.; p = 0.3; n = 4 rebanadas adrenales de cuatro ratas diferentes. Estos resultados confirman que los efectos de muscimol en las CCs están regulados por la activación de los R-GABA_A. Bicuculina también bloquea la reducción de la concentración de Ca²⁺_i inducida por muscimol.

Con la finalidad de desenmascarar los posibles efectos de la activación de R-GABA_A por el **GABA endógeno** (GABA liberado de las CCs, que por efecto del tipo de preparación creemos que se conserva en el microambiente celular y mantiene activos a los R-GABA_A), bicuculina se aplicó a la rebanada registrada durante, al menos, 6 min. Poco después de comenzar a aplicar bicuculina en la perfusión, se observó que la frecuencia y la amplitud de los transitorios de Ca²⁺₁ incrementaron, incluso algunas CCs que estaban silentes comenzaron a mostrar transitorios de Ca²⁺₁ (Figura 9a). Este incremento inesperado de la actividad espontánea, continúa brevemente aún después del lavado de bicuculina. Los trazos en la Figura 9b ejemplifican el incremento de frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca²⁺₁ (trazo superior) y otra donde muscimol no produjo ningún cambio (trazo inferior). Bicuculina incrementa la actividad en 54 % de las CCs. Efectos similares fueron observados en 5 rebanadas de glándula adrenal de cinco diferentes ratas.

37

Con la finalidad corroborar que los efectos observados al aplicar bicuculina, eran por el bloqueo de R-GABA_A y no debido a los efectos inespecíficos que puede provocar bicuculina (Druzin *et al.*, 2004; Johansson et al. 2001), se probaron otros antagonistas de los R-GABA_A (bicuculina libre de base, picrotoxina y gabazina). Todos estos antagonistas mostraron efectos similares en las CCs, incrementaron la frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca^{2+}_{i} .



Figura 9. Bicuculina bloquea los cambios en la concentración de Ca²⁺, inducidos por muscimol

e intensifica los transitorios espontáneos de Ca²⁺, de las CCs en rebanada. a) Gráfica tipo raster $(\Delta F(t))$ de 201 CCs individuales de una rebanada de médula adrenal de rata. El experimento consta de seis episodios: el primero: actividad basal. Segundo episodio: los cambios en la concentración de concentración de Ca²⁺, inducidos por la aplicación de muscimol (20 µM; 25 s). Tercer episodio: después de tres minutos del lavado de muscimol, la rebanada fue perfundida con bicuculina (50 µM), durante el tiempo indicado por la línea horizontal azul (5 min). Cuarto episodio: en presencia de bicuculina, la co-aplicación de muscimol (20 µM, 25 s) fue incapaz de inducir un cambio en la concentración de Ca²⁺_i. Bicuculina también incrementó la frecuencia y amplitud de los transitorios espontáneos de Ca²⁺_i. Quinto episodio: el lavado de la bicuculina. Y sexto episodio: incremento de la concentración de Ca^{2+} ; por la despolarización que induce la aplicación de K⁺ alto. **b**) Registro de dos CCs. El primero (trazo superior) la aplicación de muscimol indujo un incremento de la concentración de Ca²⁺_i. En el trazo inferior, muscimol no induce ningún cambio en la concentración de Ca²⁺_i. En ambos trazos la presencia de bicuculina induce un aumento en frecuencia y amplitud de los transitorios espontáneos de Ca²⁺_i. c) Histogramas de distribución de la frecuencia de los transitorios espontáneos de Ca²⁺;; barras negras: actividad basal; barras rojas: actividad después de la aplicación de bicuculina. d) Histograma de distribución de las amplitudes de los transitorios espontáneos de Ca²⁺; barras negras: actividad basal; barras rojas: actividad después de la aplicación de bicuculina. e) El decremento de la concentración de Ca^{2+}_{i} inducido por muscimol, también es bloqueado por bicuculina. Trazos sobrepuestos de registros de diez CCs seleccionadas donde muscimol indujo una reducción de la concentración de Ca^{2+} . f) Esta respuesta fue inhibida cuando muscimol fue re-aplicado en la misma célula en presencia de bicuculina. Los trazos grises; son los trazos sobrepuestos de las señales de Ca²⁺, de diez CCs individuales. El trazo negro corresponde al promedio de los diez trazos grises (Alejandre García et al., 2016).

El histograma de frecuencia y la amplitud de los transitorios de Ca²⁺i respectivamente son mostrados en las Figuras 9c y d. Una prueba de normalidad (D'Agostino y Pearson, 1973) reveló que la distribución de la frecuencia o amplitud de transitorio de Ca²⁺i no son distribuciones normales (p < 0.0001). La frecuencia en reposo de los transitorios de Ca²⁺i oscila entre 0.65 y 13.6 transitorios de Ca²⁺i /min. La aplicación de bicuculina incrementa la mediana de la frecuencia de los transitorios de Ca²⁺i significativamente; el número de células con < 2 transitorios de Ca²⁺i /min disminuyó de 30 a 20 %, y las células con frecuencias > 6 transitorios de Ca²⁺i /min incrementaron de 15 a 45 % (Figura 9c). Los efectos de bicuculina fueron más notorios en la distribución de amplitud de los transitorios de Ca²⁺i (Figura 9d). Antes de la aplicación de bicuculina, el rango de amplitudes de los transitorios de Ca²⁺i en control, va de 0.5 a 6.2 a.u. En presencia de bicuculina, la mediana de la amplitud de los transitorios de Ca²⁺i incrementó significativamente y la distribución de las amplitudes se recorrió a la derecha (Figura 9d), el 73 % de las CCs mostró transitorios

de Ca^{2+}_{i} con amplitudes > 4 a.u. Estos resultados nos permiten concluir que bicuculina induce el incremento y la intensificación de los transitorios de Ca^{2+}_{i} en más del 50 % de las CCs y esto parece ser independiente de las respuestas a muscimol.

Estos resultados son una evidencia de la presencia del GABA endógeno en el microambiente celular de la rebanada de la glándula adrenal y su aparente participación en la inhibición tónica de las fluctuaciones espontáneas del Ca²⁺_i. Esta inhibición resultó difícil de entender, sobre todo porque no parecía estar relacionada con la respuesta de las CCs a muscimol, esto nos llevó a realizar experimentos que pudieran descartar tanto efectos inespecíficos del fármaco utilizado (bicuculina), como a investigar a qué nivel, el GABA endógeno, inhibe la actividad tónica de las CCs.

Efectos de la bicuculina en la post-hiperpolarización de los potenciales de acción en las CCs

Se ha reportado que los efectos inducidos por bicuculina en las neuronas, pueden ser inespecíficos, esto es debido a que la bicuculina puede bloquear canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (SK) y activados por voltaje, en el sistema nervioso central (Druzin *et al.*, 2004; Johansson et al. 2001). Por lo tanto, los efectos que induce la bicuculina en los transitorios espontáneos de Ca²⁺ en las CCs, podrían deberse al bloqueo de los canales K⁺ más que a la inhibición de los R-GABA_A. Para descartar esta posibilidad, se registró la post-hiperpolarización (PHP) que sigue al potencial de acción en las CCs en la rebanada (debido a que en esta fase del potencial de acción se abren canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y de voltaje); posteriormente, la PHP de cada célula se comparó con y sin bicuculina (50 µM; ver Figura 10a). Las amplitudes al pico de las PHP fueron de 16.1 ± 1 vs. 16.0 ± 1 mV (antes y después de bicuculina respectivamente; media ± EE; p > 0.999; n = 5 CCs; Figura 10b). El porcentaje de la amplitud normalizada de las PHP con bicuculina fue: 99.4 ± 0.8 % (Figura 10c). Estas observaciones sugieren que bicuculina no bloquea canales de K⁺ en las CCs de la médula adrenal y, por lo tanto, el incremento en frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca²⁺ i no es un efecto indirecto de la bicuculina (Alejandre García et al. 2016).



Figura 10. Bicuculina no afecta la PHP registrada de CCs. La post-hiperpolarización (PHP) que sigue al potencial de acción, fue registrada de las CCs por medio de la técnica de parche perforado. El potencial de membrana se mantuvo en -60 mV y los potenciales de acción fueron estimulados por la inyección de breves pulsos de corriente despolarizante (7 ms; 10–20 pA). **a)** Los potenciales de acción se registraron en la misma CC, antes (trazo negro) y después (trazo rojo) de la aplicación de bicuculina; los trazos se muestran sobrepuestos. El pulso despolarizante que se inyectó, se muestra en la parte inferior. El recuadro: es una expansión del segmento indicado con el rectángulo dibujado en líneas punteadas. b) Gráfica de la amplitud al pico de la PHP antes (círculos negros) y después (círculos rojos) de la aplicación de bicuculina (n = 5 CCs). c) El porcentaje de cambio de la amplitud de la PHP normalizada antes (barra negra) y después (barra roja) de la aplicación de bicuculina.

El GABA endógeno no inhibe a las CCs por un cambio en la resistencia de entrada

El incremento de los transitorios de Ca²⁺i inducido por la bicuculina se podrían explicar por una inhibición tónica inducida por el GABA endógeno, está inhibición puede ser causada por la activación constante de los R-GABA_A en las CCs, que promueve una disminución de la resistencia en la membrana celular (Brickley *et al.*, 1996; Stell y Mody, 2002). La inhibición de los R-GABA_A, aumentaría la resistencia de la membrana y ésto facilitaría la excitabilidad celular en respuesta a un estímulo.

Si el GABA endógeno mantiene inhibidas a las CCs a través de la disminución en su resistencia de entrada (efecto post-sináptico del GABA), la aplicación de picrotoxina (100 μM) debería inducir un incremento en la resistencia de las CCs.

Para probar esta hipótesis, las CCs fueron registradas en patch-clamp en la configuración

de parche perforado, todas las CCs registradas se mantuvieron en -70 mV y posteriormente se aplicaron pulsos de corriente (de -10 a 8 pA en incrementos de 2 pA). La resistencia de entrada de las CCs fue estimada mediante la regresión lineal de la relación corriente-voltaje de los datos de las CCs. Todas las curvas I-V en la gráfica de la Figura 11a corresponden a cada una de las CCs registradas en condiciones control. Los valores de la resistencia de entrada de las CCs se encuentran en el rango de 1 a 6.6 G Ω ; las curvas en color verde corresponden a las CCs donde la resistencia se mantuvo igual, aun después de la aplicación de picrotoxina; las curvas marcadas en rojo en la Figura 11a, corresponden a la condición control de 4 CCs que posteriormente presentaron un cambio en su resistencia por la aplicación de picrotoxina (de 1.6 \pm 0.1 a 2.6 \pm 0.2 G Ω). En la Figura 11b se graficaron las curvas de dos células: en verde se muestran los valores de la curva I-V de una CC donde la adición de picrotoxina no produjo ningún cambio; en rojo se muestra una la relación I-V de una CC donde la aplicación de picrotoxina modificó su resistencia (1 G Ω). En ambos casos, las circunferencias representan los datos en condiciones control y los puntos representan el registro, en la misma célula, en presencia de picrotoxina. Las respuestas de las CCs a los comandos de corriente graficados en la Figura 11a se pueden observar en la Figura 11c: los trazos de una CC donde la resistencia no cambió en presencia de picrotoxina. Y la Figura 11d muestra la respuesta de una CC representativa, donde la resistencia aumentó en presencia de picrotoxina. El porcentaje de CCs donde la aplicación de picrotoxina modificó la resistencia de entrada de la membrana (23%), no corresponde a 54 % de CCs que incrementa su actividad (incremento de los transitorio de Ca^{2+}) en presencia de bicuculina. Por lo tanto, la inhibición que induce el GABA endógeno en las CCs, no parece estar relacionada con una inhibición tónica GABAérgica en las CCs (Inhibición post-sináptica).



Figura 11. Efectos de picrotoxina en la resistencia de las CCs. Registros del potencial de membrana (Vm) en las CCs con *patch-clamp* en configuración de parche perforado. Todas las células se mantuvieron en -70mV y posteriormente se aplicaron comandos de corriente (de -10 a 8 pA en incrementos de 2 pA). **a)** La gráfica ilustra las respuestas a la relación corriente (I) y voltaje (V) para determinar la resistencia en 17 CCs en condiciones control, los valores de la resistencia se encuentran en el rango de 1 a 6.6 GΩ; los trazos verdes, representan a las CCs que no modificaron su resistencia de entrada por aplicación de picrotoxina (100 μ M); los trazos en color rojo, indican la relación I-V de 4 de 17 CCs en condiciones control donde la posterior aplicación de picrotoxina, modificó la resistencia de entrada (> 1 GΩ) en las CCs. **b)** La resistencia de entrada fue estimada mediante una regresión lineal aplicada en la relación I-V de los datos, el trazo verde indica una célula donde la resistencia de entrada aumentó cuando se aplicó picrotoxina (de 1.8 a 2.5 GΩ). **c)** Cambios en voltaje de una CC donde la adición de picrotoxina no tiene ningún efecto. **d)** Registro de la CC donde la adición de picrotoxina produjo un cambio en su resistencia de entrada.

Los transitorios de Ca²⁺, inducidos por bicuculina en las CCs, son independientes de la respuesta a muscimol.

Al observar los efectos que muscimol induce en las señales de Ca²⁺_i de las CCs en los resultados que hemos visto anteriormente (Figura 4b, c), podríamos especular que el GABA endógeno se encuentra despolarizando, hiperpolarizando o sin ningún efecto en las CCs. Por ejemplo: Ya que el incremento de los transitorios de Ca²⁺_i que induce bicuculina resulta de la interrupción de la inhibición tónica GABAérgica, podríamos esperar que esto solo

sucediera en las CCs que se hiperpolarizan con muscimol. Esto representaría lo que se espera del un agonista y un antagonista; que el agonista (muscimol) induzca inhibición y que el antagonista (bicuculina) en este caso promueva lo opuesto, excitación. Sin embargo, el incremento de los transitorios de Ca²⁺i inducidos por bicuculina parece ser independiente de las respuestas a muscimol, sugiriendo que, incluso, no es necesaria la expresión de R-GABA_A en la membrana de las CCs para que bicuculina promueva el incremento de los transitorios de Ca²⁺i.

Figura 12. Distribución espacial de las CCs de una rebanada, que respondieron a muscimol y bicuculina. Mapa de dos dimensiones muestra la posición de todas las CCs registradas en la médula adrenal. El tipo de respuesta a muscimol está indicado como: incremento de la concentración de Ca^{2+} (puntos rojos), decremento de la concentración de Ca²⁺i (puntos azules), sin cambios (círculos abiertos). Los círculos verdes corresponden a las CCs que respondieron a bicuculina un con incremento de los transitorios de Ca²⁺, (T- Ca^{2+}_{i}).



El mapa de la Figura 12 hace evidente esa conjetura, en él se observa la posición de cada CC registrada y el tipo de respuesta inducida por muscimol: incremento, decremento o ningún cambio en la concentración de Ca²⁺_i. Adicionalmente a la respuesta de muscimol, en el mapa se representa con un círculo verde a las CCs que responden a la aplicación de bicuculina con un incremento en la frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca²⁺_i (52 % en este ejemplo): En proporción a las CCs que responden a bicuculina: 29 % corresponden a CCs que incrementaron su concentración de Ca²⁺_i en respuesta a muscimol, 16 % mostraron una reducción y en 7 % de las CCs no se observa ningún cambio. Con esto se puede concluir que los transitorios de Ca²⁺_i inducidos por bicuculina son independientes a las respuestas de muscimol. Se observan CCs que aparentemente no responden a muscimol, pero si responden a bicuculina, esto podría indicar que no es necesaria la

expresión de R-GABA_A o que las CCs presenten una respuesta evidente ala activación de R-GABA_A en la membrana de las CCs.

Las entradas sinápticas colinérgicas contribuyen a la generación de transitorios espontáneos de Ca²⁺, en las CCs

La estimulación sináptica en las CCs, de la rebanada adrenal, se puede registrar en forma de corrientes post-sinápticas excitatorias (**EPSCs**, por sus siglas en inglés). Estas corrientes son generadas por la activación de receptores nicotínicos (receptores de ACh) y se sabe que contribuyen a la generación de transitorios de Ca²⁺_i en las CCs (Barbara *et al.*, 1998).

Las EPSCs en las CCs son reguladas por activación de receptores nicótinicos, estos pueden ser inhibidos por antagonistas específicos como hexametonio o mecamilamina (Barbara *et al*, 1998). El experimento que se muestra en la Figura 13, evalúa la influencia de la transmisión colinérgica en la generación de los transitorios de Ca²⁺_i en las CCs. Primero, se registraron las señales de Ca²⁺_i de las CCs en condiciones control, y después, se aplicó nicotina, un agonista del receptor nicotínico (5 μ M; 15 s), esto produjo un aumento robusto en la concentración de Ca²⁺_i en cada CC registrada. El aumento en la concentración de Ca²⁺_i inducido por nicotina fue evitado por mecamilamina (10 μ M) comprobando la presencia de receptores colinérgicos nicotínicos (Sala *et al.*, 2008).

Interesantemente, la aplicación del bloqueador de estos receptores, mecamilamina, también redujo reversiblemente la frecuencia de los transitorios de Ca^{2+}_i en 18 ± 4 % de las CCs. La Figura 13a ejemplifica dos CCs registradas: en una de ellas los transitorios de Ca^{2+}_i son completamente inhibidos por mecamilamina y en otra célula, mecamilamina no tiene ningún efecto en los transitorios de Ca^{2+}_i . El incremento en la concentración de Ca^{2+}_i inducido por nicotina fue bloqueado por mecamilamina en ambas CCs. Este experimento demuestra que un pequeño porcentaje de las CCs tiene actividad espontánea influenciada por la transmisión colinérgica y que todas las CCs son propensas a ser estimuladas colinérgicamente (Alejandre-García *et al.*, 2016).

Debido a los resultados de la Figura 13, se planteó la hipótesis de que: la transmisión sináptica colinérgica podría estar influenciando el incremento de los transitorios de Ca²⁺_i generados cuando se aplica bicuculina en las CCs.

Para probar esta hipótesis, después de que la actividad basal fue registrada, se aplicó bicuculina (50 μ M) en las CCs de una rebanada adrenal, esto produjo un incremento de los transitorios de Ca²⁺_i en 45 ± 3 % de las CCs (Figura 13b). Con bicuculina presente, mecamilamina fue co-aplicada, esto provocó la reducción inmediata de los transitorios de Ca²⁺_i inducidos por bicuculina en todas las CCs. Después de lavar la mecamilamina, los efectos de bicuculina en los transitorio de Ca²⁺_i se reanudaron. Los trazos de la Figura 13b ejemplifican dos CCs: una de ellas (trazo superior) donde mecamilamina inhibe completamente los transitorios de Ca²⁺_i. El trazo inferior ilustra el ejemplo de una CC donde ni bicuculina ni mecamilamina afectaron a los transitorios de Ca²⁺_i. Resultados similares fueron obtenidos en 4 rebanadas de 4 ratas diferentes. Estos experimentos soportan la hipótesis de que bicuculina induce desinhibición de la transmisión sináptica colinérgica, nuestra propuesta fue que el GABA endógeno activa tónicamente R-GABA_A en la presinapsis y la mantiene inhibida (Alejandre-García *et al.*, 2016).



Figura 13. Efectos de nicotina y mecamilamina en las CCs. a) Registro de dos CCs representativas de una rebanada adrenal, donde se aplicó nicotina (5 µM; 15 s; línea roja). Posteriormente se realizó

un lavado de 3 min y durante el tiempo indicado con la línea verde, se añadió mecamilamina (10 μ M, 4 min); seguido del lavado de mecamilamina y la aplicación de una solución con K⁺ alto como control de viabilidad. En todas las CCs del registro, nicotina induce un incremento transitorio de Ca²⁺_i, mismo que es bloqueado completamente en presencia de mecamilamina. El trazo superior: corresponde a una CC donde mecamilamina inhibió completamente los transitorios de Ca²⁺_i, esta célula ejemplifica lo que ocurre en 18 % de las CCs. Los transitorio de Ca²⁺_i se recuperaron después del lavado de mecamilamina. En el trazo inferior: se observa que mecamilamina no afecta los transitorios de Ca²⁺_i en la CCs. **b**) Registro de dos CCs representativas de una rebanada adrenal, donde se aplicó bicuculina (50 μ M; línea azul). Posteriormente, se co-aplicó mecamilamina (10 μ M, 4 min; línea verde), seguido del lavado de mecamilamina y bicuculina; al finalizar, se aplicó una solución con K⁺ alto como control de viabilidad. El trazo superior representa ~45 % de CCs donde bicuculina indujo un incremento en los transitorios de Ca²⁺_i, esos transitorios fueron inhibidos en presencia de mecamilamina. El trazo inferior, representa a las CCs donde, aparentemente, no se afectan los transitorios de Ca²⁺_i, ni por la presencia de bicuculina ni por mecamilamina (Alejandre-García *et al.*, 2016).

El GABA endógeno regula la función de las CCs al actuar sobre los R-GABA_A de las terminales pre-sinápticas colinérgicas

Como observamos en la Figura 13b, mecamilamina inhibe el incremento en frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca²⁺i inducido por bicuculina en las CCs (Alejandre-García *et al.*, 2016). Esto sugiere que el incremento de actividad inducido por bicuculina es inducido por estimulación colinérgica. La estimulación colinérgica despolariza el potencial de membrana, lo que puede induce la generación de potenciales de acción (Barbara *et al.*, 1998).

Para probar si el bloqueo de R-GABA_A con bicuculina o picrotoxina realmente incrementan la actividad colinérgica y despolarizan en el potencial de membrana (Vm), se registró el potencial de membrana de las CCs, por medio de la técnica de parche perforado en el modo de fijación de corriente. En la Figura 14a se puede observar que la CC que se encontraba en un Vm de -57 mV, durante la aplicación de muscimol se despolarizó (4 mV) alcanzando un Vm de -53 mV y la frecuencia instantánea entre los potenciales de acción aumenta de 0.3 basal a 0.9 Hz. Al aplicar picrotoxina el Vm también se despolarizó (-53 mV) y la frecuencia instantánea aumentó de 0.7 a 1.4 Hz. Este efecto se observó en 6 de 8 CCs registradas.

Mecamilamina inhibió el incremento en frecuencia y amplitud de los transitorios de Ca²⁺_i que se habían incrementado previamente con picrotoxina (Alejandre-García *et al.*, 2016). Mecamilamina también disminuyó la frecuencia instantánea de los potenciales de acción (la frecuencia disminuyó de 1.4 Hz a 0.7 Hz) en promedio. Este experimento respalda la hipótesis de que bicuculina participa en la desinhibición de la transmisión sináptica colinérgica, probablemente al bloquear a los R-GABA_A pre-sinápticos, tónicamente estimulados por el GABA del microambiente.

Si el incremento en la actividad de las CCs es debido a que el bloqueo de R-GABA_A induce que las terminales nerviosas liberen más ACh; debe ser posible observarlo a través del registro de las EPSCs. El experimento ilustrado en la Figura 14a sugiere que el aumento en la frecuencia de los potenciales de acción por picrotoxina podría ser debido a que la transmisión colinérgica se desinhibe. Para probar directamente esta hipótesis, las EPSCs fueron registradas en las CCs en rebanada.

La Figura 14b ejemplifica un registro continuo de *patch-clamp* en configuración de célula entera en fijación de voltaje para registrar los cambios en la corriente. La CC fue fijada en -80 mV para maximizar la corriente entrante causada por la apertura de receptores ionotrópicos nicotínicos. Bajo condiciones control, se registraron muy pocas EPSCs espontáneas. Después de 2–3 min de haber estado en presencia de 50 μ M de bicuculina, las EPSCs espontáneas de diferentes amplitudes comenzaron a aparecer, gradualmente incrementaron su frecuencia y amplitud. Las corrientes entrantes, representan la liberación de vesículas que contienen ACh, las EPSCs fueron rápidamente bloqueadas por mecamilamina. Resultados similares fueron obtenidos en 5 de 7 CCs de 7 diferentes rebanadas. Ésta es la primera descripción de mecanismos moduladores de la actividad de las CCs en la glándula adrenal que involucra una inhibición pre-sináptica de la transmisión colinérgica por GABA.

Nuestros experimentos apoyan la hipótesis de que bicuculina desinhibe la trasmisión sináptica colinérgica espontánea, ello provoca un aumento de los transitorios de Ca²⁺_i y de

48

potenciales de acción en las CCs. Esto puede ocurrir porque GABA endógeno bloquea a los R-GABA_A en las fibras pre-sinápticas colinérgicas (Alejandre-García *et al.*, 2016).



Figura 14. Efectos del agonista y antagonista GABA_A en la excitabilidad de las CCs. a) Registros del potencial de membrana (Vm) en las CCs con patch-clamp en configuración de parche perforado, la célula genera potenciales de acción espontáneos. En este ejemplo, la aplicación aguda de muscimol induce una despolarización de la CCs (~ 4 mV) e incrementa la frecuencia de los potenciales de acción, mientras que la picrotoxina (100 μ M) produce una despolarización gradual (~ 4 mV) y un marcado incremento en la tasa de generación de los potenciales de acción. Picrotoxina incrementó la frecuencia instantánea de los potenciales de acción en 6 de 10 CCs (0.5 ± 0.06 Hz). El resto de las CCs no mostraron efecto. La aplicación de mecamilamina (10 µM: línea horizontal verde) disminuyó el incremento inducido en la frecuencia instantánea de los potenciales de acción inducidos con picrotoxina. b) Efectos de la bicuculina y la mecamelamina en las corrientes post-sinápticas excitatorias (sEPSCs, por sus siglas en inglés). Registro continuo de una CC en configuración de célula entera (whole-cell) en fijación de voltaje, el potencial de membrana de la CC registrada se mantuvo en -80mV para maximizar la corriente entrante. Bajo condiciones control, la CC presentó muy pocas sEPSCs; también está indicada la aplicación de 50 µM bicuculina (línea azul) y bicuculina más mecamelamina (línea verde). b_A) La escala del registro en el tiempo indicado (línea roja), está expandida y corresponde a la actividad basal de la CCs. b_B) Bicuculina incrementa gradualmente la frecuencia y amplitud de las sEPSCs. b_C) La aplicación de mecamilamina bloquea rápidamente las EPSCs inducidas por bicuculina confirmando que las corrientes generadas debido a la activación de receptores nicotínicos (Alejandre García et al., 2016).

GABA endógeno reduce las señales de Ca²⁺i de las CCs estimuladas sinápticamente por activación del nervio esplácnico

Las inmunofluorescencias mostradas en la Figura 15 inspiraron la posibilidad de registrar las señales de Ca²⁺_i en las CCs activadas al estimular directamente el nervio esplácnico. Las inmunofluorescencias nos permitieron observar que era posible mantener el nervio esplácnico intacto en un corte de glándula adrenal.



Figura 15. Inervación del nervio esplácnico a la médula adrenal. a) Micrografías de una sección de rebanada de glándula primera adrenal. En la micrografía (superiorizquierda), se observa en azul la tinción de los núcleos de las CCs con DAPI. La diferencia en la densidad celular entre la corteza (C) y médula adrenal (M), nos ayudan a distinguir claramente los dos tejidos de la glándula. En la segunda micrografía (superior-derecha) se distingue que la marca de (sinaptofisina, Synp una glicoproteína integral de membrana y de vesículas presinápticas) se encuentra

principalmente en la zona correspondiente a la médula adrenal (M). El tercer recuadro (parte inferior izquierdo) corresponde a la marca de SMI-32, un anticuerpo contra neurofilamentos, el cual nos ayudó a distinguirse el nervio esplácnico (señalado con una flecha blanca) y su entrada a través de la corteza adrenal hasta llegar a la médula. En el ultimó recuadro (inferior derecho) muestra las tres diferentes inmunofluorescencias superpuestas.

Matsuoka y colaboradores en el 2008 observaron que la estimulación colinérgica induce un incremento en la concentración de Ca²⁺_i en las CCs, ellos también observaron que la aplicación de GABA disminuye ese incremento, pero únicamente en las CCs con respuesta

a GABA. Debido a estos resultados, ellos propusieron que se trataba de una "acción dual de GABA", potenciación e inhibición de una misma CC por GABA.

Después de analizar todas nuestras evidencias de inhibición pre-sináptica y observar los resultados de Matsuoka y colaboradores en el 2008, pensamos que los resultados de su trabajo eran similares, en parte, a lo que nosotros esperábamos observar al estimular el nervio esplácnico y aplicar muscimol. La diferencia es que, si obteníamos resultados similares, las conclusiones serían diferentes, ya que para nosotros la inhibición que puede inducir GABA, es a nivel de las terminales pre-sinápticas y esa inhibición es independiente de la presencia de R-GABA_A en las CCs. Ya hemos observado que la activación de los R-GABA_A por el GABA endógeno bloquea tónicamente a la pre-sinapsis colinérgica, ahora nos preguntamos si la pre-sinapsis se mantendrá bloqueada, incluso, durante la estimulación eléctrica.

Para probar esta hipótesis se estimuló el nervio esplácnico con un electrodo bipolar concéntrico, mientras se registraban los cambios en la concentración de Ca²⁺_i de las CCs en la rebanada adrenal, por medio de fluorescencia. Para corroborar que el incremento en la señal de Ca²⁺_i en las CCs, era debido a la estimulación colinérgica, se aplicó mecamilamina (10 μ M) en el baño de registro por 4 min antes del segundo estímulo eléctrico. Las señales de Ca²⁺_i inducidas por el estímulo disminuyeron su amplitud 60% respecto al primer estímulo sin mecamilamina (n=26 células; 3 rebanadas, 1 rebanada/1 rata; p<0.0001) (Figura 16a). Esta observación demuestra que el incremento de Ca²⁺_i en las CCs inducido por la estimulación eléctrica del nervio esplácnico, es debido a la activación de receptores nicotínicos por la ACh liberada.

Para comprobar que el GABA inhibe a las terminales pre-sinápticas. Se aplicó muscimol 1 μ M en el baño (para tratar de simular la concentración del GABA endógeno), durante 2 min, antes del segundo estímulo. El incremento de las señales de Ca²⁺_i en las CCs, inducido por el estímulo, disminuyó en amplitud; 30% respecto al primer estímulo aplicado en condiciones control (n=30 células; 3 rebanadas, 1 rebanada/1 rata; p= <0.0001) (Figura 16b). Con esto podemos concluir que la concentración del GABA presente en el ambiente

51

de la médula adrenal, es suficiente para inhibir a las terminales pre-sinápticas y, por lo tanto, las señales de Ca²⁺, inducidas por la estimulación.

Si el GABA endógeno inhibe a las terminales pre-sinápticas, entonces, el bloqueo de los R-GABA_A induciría una mayor actividad de las terminales nerviosas. En la Figura 16c se puede observar que las 15 CCs de una rebanada adrenal respondieron a un tren de estimulación eléctrica, durante dos segundos (10 ms por pulso, a 10 Hz), con un incremento de la concentración de Ca²⁺_i. Antes de la aplicación de un segundo estímulo se aplicó picrotoxina 100 μM durante 3 min.; esto provocó un incremento del 33 % en la amplitud de las señales de Ca²⁺_i en las CCs, respecto del primer estímulo (n= 25 células; 3 rebanadas, 1 rebanada/ 1 rata; p=<0.0001). Después de 10 min de lavado de la picrotoxina, la señal de Ca²⁺_i regresó a los valores control. Con estos resultados podemos concluir que el GABA endógeno bloquea de manera tónica a los R-GABA_A en las terminales pre-sinápticas, lo cual podría estar disminuyendo la intensidad de activación de las terminales sinápticas.



Figura 16. La picrotoxina promueve el incremento de la concentración de Ca^{2+}_i inducida por estimulación eléctrica del nervio esplácnico. La estimulación eléctrica simpato-adrenal fue realizada al estimular las fibras del nervio esplácnico con un electrodo bipolar concéntrico (50 μ m). Se aplicaron pulsos de voltaje en las fibras nerviosas (de 10 a 30 V) a 10 Hz, durante 1.5 y 2 s, hasta

observar el incremento de la concentración de Ca²⁺_i en las CCs de las rebanadas adrenales previamente incubadas con Fluo-4. a) Gráfica tipo raster ($\Delta F(t)$) de 12 CCs individuales de una rebanada de médula adrenal de rata que respondieron a la estimulación eléctrica (puntos rojos en la parte superior de cada gráfica raster) con un incremento de la concentración de Ca²⁺_i. El experimento consta de tres episodios: el primero: los cambios en la concentración de Ca²⁺, inducidos por la aplicación del estímulo eléctrico (1.5 s a 10 Hz) en condiciones basales. Segundo episodio: el efecto producido por el mismo estímulo en presencia de mecamilamina (10 µM, indicada por la línea horizontal verde, Mec); la presencia de mecamilamina indujo una reducción del 60 % de la señal de Ca²⁺_i. Tercer episodio: el efecto en la concentración de Ca²⁺_i producido por el estímulo, después de 4 minutos del lavado de mecamilamina. **b**) Gráfica raster ($\Delta F_{(t)}$) de 12 CCs de una rebanada que respondieron a la estimulación eléctrica (2s, 10 Hz) con un incremento de la concentración de Ca^{2+}_{i} . Este protocolo consta de los mismos episodios que la figura a, excepto que durante el segundo episodio se aplicó 1 µM de muscimol (indicado por la línea horizontal roja), la presencia de muscimol redujo 30 % la señal de Ca²⁺_i inducida por el estímulo. c) Gráfica raster ($\Delta F(t)$) de 15 CCs de una rebanada que respondieron a la estimulación eléctrica (2s, 10 Hz) con un incremento de la concentración de Ca²⁺_i. Este protocolo consta de los mismos episodios que la figura a y b, excepto que durante el segundo episodio se aplicaron 100 µM de picrotoxina (indicado por la línea horizontal azul), esto provocó un incremento del 33 % las señales de Ca²⁺_i, respecto del primer estímulo. Los trazos en la parte inferior de cada gráfica raster, muestra la señal de Ca²⁺i de una CC representativa para cada caso.

Secreción de catecolaminas inducida por muscimol y por la inhibición de R-GABA_A

Recordemos que la estimulación de los R-GABA_A, por aplicación del GABA o muscimol, resulta consistentemente en un aumento de la concentración de Ca²⁺_i y consecuentemente en un incremento en la secreción de catecolaminas en CCs de varias especies (Kataoka *et al.*, 1986).

Nosotros intentamos reproducir esos resultados con el registro amperométrico de catecolaminas en CCs de cultivo, pero no observamos ningún efecto al aplicar muscimol en las CCs (Alejandre *et al.*, 2018). De cualquier manera, el principal interés que teníamos en el registro amperométrico de las catecolaminas era para observar si la inhibición que induce el GABA endógeno en la actividad de las CCs también prevenía la secreción de catecolaminas. Para llevar acabo esta prueba, necesitábamos realizar esos registros en la rebanada.

Los registros amperométricos de catecolaminas se realizaron usando una fibra de carbono en la rebanada de glándula adrenal (ver métodos). Lo primero que observamos fue, que al

acercar el electrodo de registro a la rebanada, la basal siempre fue mayor a 10 PA y se mantenía así durante todo el registro. Ya que esto nunca sucede en los registros en cultivo, nos hizo suponer que el electrodo estaba censando catecolaminas secretadas de todas las CCs activas en la rebanada. En la rebanada, el nivel de la basal es muy variable, esta variabilidad puede depender tanto de las condiciones del electrodo, como del tiempo que haya transcurrido desde de la obtención de las rebanadas.

Posteriormente, se registró la secreción basal de catecolaminas durante 3 min. La liberación espontánea de catecolaminas de una célula se distingue por la generación de espigas amperométricas mayores a 10 pA. Después de eso, en el baño se colocaron 20 µM de muscimol. Como se esperaba, los efectos de la aplicación de muscimol en las células registradas fueron variables, algunas células incrementaron la frecuencia de sus espigas y otras no. Sin embargo, un efecto que se observó en todas las rebanadas registradas fue la elevación de la basal, la aplicación de muscimol promueve la formación de una meseta, lo que probablemente se debe al que el electrodo registra todas las catecolaminas secretadas por la población de CCs donde muscimol es despolarizante (Figura 17a). Estos resultados coinciden con lo reportado en otros trabajos; la activación de R-GABA_A induce secreción de catecolaminas de las CCs.



Figura 17. Registros amperométricos obtenidos de CCs en la rebanada adrenal. a. Registro amperométrico de la secreción de catecolaminas de las CCs, en condiciones basales y después de la

aplicación de muscimol (20 μ M, 30 s). **b.** El ejemplo de un registro obtenido de una CC que fue expuesta a 50 μ M de bicuculina durante 2 min.

Por último, en otras rebanadas, se aplicaron 50 µM de bicuculina, esto también indujo un incremento en la basal, aun falta determinara si las CCs registradas incrementan o no la frecuencia de sus espigas amperométricas en presencia de bicuculina, así como la proporción de CCs donde esto ocurre. Este resultado nos indica que el bloqueo de R-GABA_A induce el incremento en la secreción de catecolaminas poblacional. Por lo tanto, podríamos proponer que GABA endógeno mantiene inhibida a la secreción de catecolaminas. Estos resultados preliminares, nos permitieron observar la presencia del microambiente celular que, se proponía, se conservaba en la preparación de la rebanada adrenal. Por otro lado, nos permitió confirmar nuestra hipótesis de que el GABA endógeno mantiene una disminución tónica de la secreción de catecolaminas de las CCs.

Efectos de la activación del R-GABA_A con muscimol en las CCs

En neuronas inmaduras del SNC, la activación de los R-GABAA, es despolarizante (excitatoria) debido a la expresión de los co-transportadores Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC1) que mantienen la concentración de Cl⁻i elevada y el E_{Cl} está despolarizado respecto al potencial de reposo de la membrana (Vm) (Ben-Ari, 2002). Se ha propuesto que esta acción se mantiene en neuronas sensoriales y neuronas del ganglio de la raíz dorsal, debido a que no expresa el transportador de K⁺/Cl⁻ (KCC2) (Kanaka et al. 2001) el cual disminuye la concentración de Cl⁻_i y mantiene el E_{Cl} negativo en relación con el Vm (Staley *et al.*, 1996). En neuronas maduras, las acciones del GABA se vuelven inhibitorias debido al incremento en la expresión del co-transportador de KCC2. Estos conceptos han cambiado recientemente (Zilberter, 2016) debido a que el cambio inducido por el GABA de excitatorio a inhibitorio durante el desarrollo que se observó en rebanadas, no fue confirmado en experimentos con optogenética in vivo (Valeeva et al., 2016). Esto ha generado controversia respecto a las implicaciones que tiene uno u otro tipo de preparación (rebanada vs preparación in vivo). Sin embargo, en neuronas maduras del núcleo supraquiasmático, el potencial de reversión de las corrientes post-sinápticas GABAérgicas (E_{GABA}) muestra variaciones diurnas de casi 30 mV (Alamilla et al., 2014) y la estimulación GABAérgica induce diferentes cambios en la concentración de Ca²⁺i, lo que sugiere diferencias sustanciales en los niveles de la concentración de Cl⁻i (Irwin y Allen, 2009).

Del mismo modo, en las CCs en la rebanada de glándula adrenal, muscimol produce tanto incrementos como decrementos de la concentración de Ca²⁺_i, en diferentes CCs de la misma rebanada adrenal (Alejandre-García et al., 2016). La elevación de la concentración de Ca²⁺_i requiere de una despolarización que provoque la apertura de canales de Ca²⁺ activados por voltaje. De ahí que en las CCs, probablemente, el E_{CI} sea positivo respecto al Vm, como en las CCs de bovino, donde se observó la expresión de NKCC1 (Xie *et al.*, 2003).

En efecto, el E_{CI} medido en las CCs de rata fue de -38.2 mV, consistente con una concentración de Cl⁻_i de 33 mM (Matsuoka *et al.*, 2008). En ese sentido, nuestros resultados respecto al incremento en la concentración de Ca²⁺_i regulado por los R-GABA_A en las CCs, son consistentes con los reportes que indican que el GABA induce la liberación de catecolaminas de CCs (Inoue *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestros resultados, no observamos expresión del trasportador NKCC1 en las CCs y además la incubación con bumetanida (el bloqueador de estos transportadores), no disminuyó el incremento de la concentración de Ca²⁺_i inducido por los R-GABA.

Interesantemente, muscimol también induce la disminución de la concentración de Ca²⁺_i en una subpoblación de CCs, este fue un efecto que también se previno con bicuculina. En estas CCs, el E_{CI} debe ser negativo en relación al V_m y la activación del R-GABA_A hiperpolariza el potencial de membrana, lo que probablemente reduce el influjo de Ca²⁺ por la disminución en la probabilidad de apertura de los canales de Ca²⁺ activados por voltaje. En los resultados de este trabajo se observó que el co-transportador KCC2 puede ser responsable de mantener la concentración de Cl⁻_i baja y, por lo tanto, de mantener el E_{CI} negativo.

La carencia de los efectos de muscimol en ~1/3 de las CCs podría resultar por la falta o la pobre expresión de los R-GABA_A. Otra posibilidad sería que el E_{CI} puede estar muy cercano al Vm y muscimol no produciría un flujo neto de Cl⁻, ni cambio alguno en el potencial de membrana. La diversidad de las repuestas en la concentración de Ca²⁺_i, por GABA_A en las CCs en rebanada, sugiere una disparidad del E_{CI} entre la población de CCs (Alejandre-García *et al.*, 2016).

Es aceptable que las CCs respondan al GABA con excitación o inhibición dependiendo de la concentración de Cl⁻_i (Sarup *et al.*, 2003). En este sentido, sabemos que al incubar una rebanada adrenal con una solución salina con baja concentración de Cl⁻, el incremento de la concentración de Ca²⁺_i inducida por muscimol es disminuido substancialmente o no se

57

lleva a cabo (Alejandre-García *et al.*, 2018), esto puede ser debido a que el Cl⁻ escapa de las CCs y los co-trasportadores NCC o intercambiadores HCO3⁻/Cl⁻ (Pendrina) (Lazo-Fernandez *et al.*, 2015), ya no son capaces de mantener la concentración de Cl⁻_i alta en las CCs. Los resultados de este trabajo mostraron que el incremento de la concentración de Ca²⁺_i inducido por muscimol decrementa en presencia de triclormetiazida, inhibidor de NCC y del intercambiador pendrina, este último con evidencias de estar presente en las CCs (ver Figura 8).

El GABA endógeno regula la función de las CCs al actuar sobre los R- GABA_A en la pre- y post-sinapsis

En el SNC, existen estrategias que ayudan a mantener baja la concentración de GABA. Por ejemplo: la enzima que cataboliza el GABA, GABAT (GABA transaminasa) y un transportador del GABA en la membrana plasmática, GAT (Kowalczyk y Kulig, 2014; Sarup *et al.*, 2003). Interesantemente, GABAT y GAT no son expresados en la glándula adrenal (Matsuoka *et al.*, 2008), esta situación podría favorecer la acumulación del GABA en los sitios de liberación e inducir la acumulación del GABA extracelular. Por otro lado, es necesario explicar cómo es posible que los R-GABA_A sostengan una activación persistente en la glándula adrenal, por ejemplo: que sean receptores de alta afinidad y que no se desensibilizan. En ese sentido, se ha reportado que las CCs expresan R-GABA_A con subunidades δ , esas subunidades les confieren esas características a los R-GABA_A (Matsuoka *et al.*, 2008).

Nosotros hubiéramos esperado que el incremento en la actividad celular inducido por bicuculina, que resulta de la interrupción de la inhibición tónica GABAérgica de las CCs, solo se hubiera presentado en las CCs que responden a muscimol con un decremento en la concentración de Ca²⁺_i (hiperpolarización). Sin embargo, el incremento en los transitorios de Ca²⁺_i inducidos por bicuculina es independiente de la respuesta a muscimol (incremento, decremento o ningún efecto en la concentración de Ca²⁺_i) esto sugiere que los R-GABA_A expresados en las CCs, no están involucrados en la inhibición que induce el GABA endógeno. En CCs de rata, en cultivo e *in situ*, se sugirió que la activación de los R-GABA_A

podría cambiar la resistencia eléctrica de la membrana, lo cual obstaculizaría la generación de los potenciales de acción y reduciría las oscilaciones espontáneas de la concentración de Ca²⁺i (Busik *et al.*, 1996). Si ese fuera el caso, la activación persistente de los R-GABA_A inhibiría los transitorios de Ca²⁺i y al bloquear a los R-GABA_A podría incrementar la excitabilidad de las CCs. Sin embargo, al hacer la prueba experimental de dicha propuesta, observamos que el 80% de las CCs no modifican su resistencia de entrada en respuesta al bloqueo de los R-GABA_A, lo cual indica que la inhibición GABAérgica de las CCs debe ser por otros mecanismos. Estos resultados, sustentan la propuesta de que los R-GABA_A pueden estar ubicados en las pre-sinapsis y ahí pueden regular la liberación espontánea de ACh.

Los R-GABA_A regulan la inhibición pre-sináptica en la médula adrenal

La regulación de la liberación de neurotransmisores por los R-GABA_A en la pre-sinapsis es un fenómeno bien establecido (Eccles *et al.*, 1963; Jang *et al.*, 2001; MacDermott *et al.*, 1999). Sin embargo, el efecto del GABA en cualquier sinapsis es difícil de predecir. El parámetro más importante para determinar el efecto de la activación de R-GABA_A, el E_{Cl}, tiene un valor que se desconoce en la mayoría de las terminales pre-sinápticas. La activación de los R-GABA_A pueden tener efectos complejos en la excitabilidad: tanto la hiperpolarización como la despolarización pueden cambiar el potencial y debilitar o aumentar la liberación de trasmisor (Draguhn *et al.*, 2008).

El papel de los R-GABA_A pre-sinápticos en la médula espinal de vertebrados, fue el primero en establecerse (Eccles *et al.*, 1962): los EPSPs mediados por glutamato en las motoneuronas son reducidas por una despolarización de las fibras aferentes primarias, por activación de R-GABA_A en las pre-sinapsis (Rudomin y Schmidt, 1999). El GABA también inhibe la liberación de péptidos en las terminales nerviosas de la pituitaria posterior (Zhang y Jackson, 1993). Muscimol incrementa la frecuencia sEPSCs en neuronas de hipocampo en CA₃ (Kim *et al.*, 2011). Esto se debe a que GABA despolariza las terminales sinápticas, lo que promueve la apertura de canales de Ca²⁺ activados por voltaje, causando un influjo de Ca²⁺ que aumenta la liberación espontánea de neurotransmisor.

Nuestros datos sugieren que el GABA endógeno se une a R-GABA_A pre-sinápticos en las terminales nerviosas colinérgicas y mantiene la liberación de ACh y los transitorios de Ca²⁺_i tónicamente inhibidos. Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte de un mecanismo regulador de la actividad espontánea de las CCs en la glándula adrenal, relacionada con la inhibición pre-sináptica por R-GABA_A. A pesar del hecho de que el GABA mismo facilita la secreción basal de catecolaminas (Matsuoka *et al.*, 2008).

Kataoka (1986) y Matsuoka (2008) observaron que la aplicación del GABA en las CCs, puede inducir la inhibición de las señales de Ca²⁺i en las CCs inducida por la estimulación colinérgica. En las observaciones de este trabajo, revalidamos esos hallazgos al evaluar el efecto de aplicar muscimol sobre las señales de Ca²⁺i en respuesta a un estímulo eléctrico. Observamos que se produce un decremento del 30 % de la señal de Ca²⁺i inducida por la estimulación del nervio esplácnico. A pesar de que estas observaciones ya se habían hecho antes, con resultados similares (Matsuoka *et al.*, 2008), hay diferencias muy claras en cuanto al objetivo del experimento y las conclusiones a las que se llegaron en dicho trabajo.

Recordemos que Matsuoka y colaboradores hacen referencia a la "acción dual" del GABA (aumento de la secreción de catecolaminas e inhibición de la liberación de catecolaminas inducida por estimulación sináptica), para ellos, ambos efectos ocurren en la post-sinapsis, ya que, solo las CCs que responden a la aplicación del GABA con un incremento de la concentración de Ca²⁺ serán las CCs donde el efecto de la estimulación eléctrica, será inhibido. Sin embargo, como hemos observado previamente en los resultados de este trabajo, la activación de los R-GABA_A puede tener efectos diversos en las CCs (despolarización, hiperpolarización e incluso no tienen ningún efecto), esto se pudo constatar en CCs en cultivo, donde la complejidad de las respuestas es únicamente de origen post-sináptico y la innervación de las células se pierde (Alejandre-García *et al.*, 2018). No obstante, recordemos que los efectos del GABA endógeno resultaron independientes de estas respuestas (ver Figura 9b). De los diferentes diseños experimentales que se han realizado, no se ha podido mostrar el mecanismo por el cual las CCs podían tener un "efecto dual" durante la activación o bloqueo de los R-GABA_A. En la

60

presente tesis, por primera vez se muestra que no hay una "acción dual" y que hay un mismo efecto del GABA para todas la CCs, considerando que el efecto de la estimulación del nervio esplácnico (incremento en la concentración de Ca²⁺; en las CCs) resultó antagónico al activar o inhibir a los R-GABA_A: decremento y aumento del efecto de la estimulación del nervio esplácnico con el agonista y antagonista respectivamente (Figura 17).



Figura 17. Esquema general de los efectos de la GABA en las CCs de rebanada de glándula adrenal de rata. De acuerdo a los resultados de este trabajo, se observaron tres diferentes respuestas a la activación aguda de los R-GABA_A (aplicación de 20 μ M de muscimol) en las CCs. Posteriormente, cualquiera de estas células fue susceptible de incrementar su actividad cuando los R-GABA_A fueron bloqueados. Así mismo, todas las CCs responden con un incremento en la concentración de Ca²⁺_i a la liberación de ACh inducida por un estímulo eléctrico en el nervio esplácnico. Aparentemente, la presencia de GABA mantienen inhibidas a las terminales nerviosas y, por lo tanto, la estimulación siempre está debilitada. Al eliminar esta inhibición, bloqueo de R-GABA_A con picrotoxina (PTX), la estimulación se potencia.
Conclusión

Los resultados de este trabajo demostraron que la activación del R-GABA_A por su agonista, muscimol, induce el incremento de la concentración de Ca²⁺_i en casi el 50% de las CCs, así como el decremento en aproximadamente el 30 % de las células. De modo que aproximadamente 80 % de las CCs responden a la activación de los R-GABA_A.

Se confirmó que muscimol puede inducir la despolarización del potencial de membrana en 7 de 16 células registradas y que 4 de 16 son hiperpolarizadas.

La despolarización que induce la activación de los R-GABA_A, es causada por un E_{CI} despolarizante que se mantiene por una concentración de CI_{i} alta en las CCs. Esto no es debido a la presencia de co-transportadores NKCC1; sino por la presencia de transportadores de NCC o de intercambiadores HCO_3^{-}/CI^{-} (Pendrina).

La hiperpolarización que induce muscimol es causada por un E_{CI} negativo respecto de Vm, el cual, se debe a una baja concentración de CI_i en las CCs, probablemente por la presencia de transportadores KCC2 que extraen el CI_i y disminuyen la concentración.

La inhibición de los R-GABA_A, reveló las implicaciones que el GABA endógeno tiene en la actividad de las CCs. El GABA endógeno induce la inhibición tónica de las terminales presinápticas del nervio esplácnico, está inhibición se mantiene incluso durante la estimulación de las fibras nerviosas.

La inhibición pre-sináptica afecta directamente a las CCs, ya que mantiene su actividad espontánea baja y su respuesta, a la estimulación colinérgica, disminuida.

Bibliografía

- Ahonen M, Joh T, Wu J, Happola O. (1989). Immunocytochemical Localization of L-Glutamate Decarboxylase and Catecholamine-Synthesizing Enzymes in the Retroperitoneal Sympathetic Tissue of the Newborn Rat. J Auton Nerv Syst 26:89–96
- Akiyama T, Yamazaki T, Kawada T, Shimizu B, Sugimachi M, Shirai M. (2010). Role of Ca²⁺-activated
 K⁺ channels in catecholamine release from in vivo rat adrenal medulla. Neurochem Int 56: 263–69.
- Alamilla J, Perez-Burgos A, Quinto D, Aguilar-Roblero R. (2014). Circadian Modulation of the Cl(⁻) Equilibrium Potential in the Rat Suprachiasmatic Nuclei. Biomed Res Int 2014:424982.
- Alejandre-García T. (2014). Tesis de Maestría: Modulación GABAérgica de las señales de calcio de las células cromafines de glándula adrenal, IFC,UNAM.
- **Alejandre-García T, Peña-del Castillo J, Hernández-Cruz A.** (2018). GABA_A receptor: a unique modulator of excitability, Ca²⁺ signaling, and catecholamine release of rat chromaffin cells. Pflugers Arch Eur J Physiol 470: 67–77.
- Alejandre-García T, Segura-Chama P, Pérez-Armendáriz M, Delgado-Lezama R, Hernández-Cruz A. (2016). Modulation of spontaneous intracellular Ca²⁺ fluctuations and spontaneous cholinergic transmission in rat chromaffin cells in situ by endogenous GABA acting on GABA_A receptors. Pflugers Arch Eur J Physiol 468: 351–65.
- Alvarez-Leefmans F, Gamino S, Giraldez F, Nogueron I. (1988). Intracellular chloride regulation in amphibian dorsal root ganglion neurones studied with ion-selective microelectrodes. J Physiol 406: 225–46.
- Amenta F, Collier WL, Erdo L, Giuliani S, Maggi CA, Meli A. (1988). GABA_A Receptor Sites Modulating Catecholamine Secretion in the Rat Adrenal Gland: Evidence from 3H-Muscimol Autoradiography and in Vivo Functional Studies. Pharmacology 37: 394–402.
- **Di Angelantonio S, Matteoni C, Fabbretti E, Nistri A.** (2003). Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. Eur J n Neurosci 17: 2313–22.
- Barbara J-G, Christophe Poncer J, Anne McKinney R, Takeda K. (1998). An Adrenal Slice Preparation for the Study of Chromaffin Cells and Their Cholinergic Innervation. J Neurosci Methods 80: 181–89.
- Barnard E, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson A, Langer S. (1998). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. Pharmacological reviews 50: 291–313.
- **Belelli D, Lambert J.** (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. Nat Rev Neurosci 6: 565–575.
- **Ben-Ari Y.** (2002). Excitatory Actions of Gaba during Development: The Nature of the Nurture. Nat Rev. Neurosci 3: 728–739.
- **Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R.** (2007). GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. Physiol Rev 87(4): 1215–1284.

Bibliografía

- **Borman J y Clapham D.** (1985). Gamma-Aminobutyric acid receptor channels in adrenal chromaffin cells: a patch-clamp study. Proc Natl Acad Sci USA 82: 2168–2172.
- **Bormann J.** (1988). Electrophysiology of GABA_A and GABA_B Receptor Subtypes. Trends Neurosci 11: 112–116.
- **Bowery N.** (1989). GABA_B Receptors and Their Significance in Mammalian Pharmacology. Trends Pharmacol Sci 10: 401–7.
- **Brandt B, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S.** (1976). Action Potentials in the Rat Chromaffin Cell and Effects of Acetylcholine. J Physiol 263: 417–39.
- Brickley S, Cull-Candy S, Farrant M. (1996). Development of a Tonic Form of Synaptic Inhibition in Rat Cerebellar Granule Cells Resulting from Persistent Activation of GABA_A Receptors. J Physiol 497:753–759.
- **Busik J, Nakamura M, Abe Y, Shibuya I, Kanno T.** (1996). Effects of GABA on Spontaneous [Ca²⁺]_c Dynamics and Electrical Properties of Rat Adrenal Chromaffin Cells. Brain Res 739: 97–103.
- Cannon W. (1929). Organization for physiological homeostasis. Physiol Rev 9: 399–431
- Choi H, Lee C, Schroeder A, Kim Y, Jung S, Kim J, Kim D, Son E, Han H, Hong S, Colwell C, Kim Y. (2008) Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. J Neurosci **28**, 5450–5459.
- **D'Agostino R, Pearson E.** (1973). Tests for departure from normality. Empirical results for the distributions of B and Vb. Biometrika 60: 613–22.
- D'Andrea P, Codazzi F, Zacchetti D, Meldolesi J, Grohovaz F. (1994). Oscillations of Cytosolic Calcium in Rat Chromaffin Cells: Dual Modulation in Frequency and Amplitude. Biochem Biophys Res Commun 205: 1264–69.
- **Douglas W.** (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. Br J Pharmacol 34: 453–474.
- **Draguhn A, Axmacher N, Kolbaev S.** (2008) Presynaptic ionotropic GABA receptors. In: Inhib. Regul. Excit. Neurotransmission. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 69–85
- **Druzin M, Haage D, Johansson S.** (2004) Bicuculline free base blocks voltage-activated K⁺ currents in rat medial preoptic neurons. Neuropharmacology 46:285–295.
- **Dunlap K y Fischbach G.** (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. J Physiol 317: 519–535.
- Eccles J, Schmidt R, Willis W. (1963) Pharmacological studies on presynaptic inhibition. J Physiol 168:500–530.
- **Eccles J, Schmidt R, Willis W.** (1962). Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. J Physiol 161: 282–97.
- **Elnasharty M, Sayed-Ahmed A.** (2014). Expression and localization of pChAT as a novel method to study cholinergic innervation of rat adrenal gland. Acta Histochem 116: 1382–89.
- García A, García-De-Diego A, Gandía L, Borges R, García-Sancho J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. Physiol Rev 86: 1093–1131.
- Gil A, Viniegra S, Gutiérrez L. (1998). Dual effects of botulinum neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells. Eur J Neurosci 10: 3369–3378.
- **González M, Oset-Gasque M, Castro E, Bugeda J, Arce C, Parramón M.** (1992). Mechanism through Which GABA_A Receptor Modulates Catecholamine Secretion from Bovine Chromaffin Cells. Neuroscience 47: 487–494.

- Harada K, Matsuoka H, Nakamura J, Fukuda M, Inoue M. (2010) Storage of GABA in chromaffin granules and not in synaptic-like microvesicles in rat adrenal medullary cells. J Neurochem 114:617–626.
- Harada K, Matsuoka H, Fujihara H, Ueta Y, Yanagawa Y. (2016) GABA signaling and neuroactive steroids in adrenal medullary chromaffin cells. Front Cell Neurosci 10:1–11.
- Hernández A, Segura-Chama P, Jiménez N, García A, Hernández-Guijo J, Hernández-Cruz A. (2011) Modulation by endogenously released ATP and opioids of chromaffin cell calcium channels in mouse adrenal slices. Am J Phys Cell Phys 300:C610– C623.
- **Holzbauer M, Birmingham M, De Nicola A, Oliver J.** (1985). In vivo secretion of 3α-hydroxy-5αpregnan-20-one, a potent anaethetic steroid, by the adrenal gland of the rat. J Steroid Biochem 22, 97–102.
- Inoue M, Hara M, Zeng X-T, Hirose T, Ohnishi S, Yasukura T, Uriu T, Omori K, Minato A, Inagaki C. (1991) An ATP-driven Cl⁻ pump regulates Cl⁻ concentrations in rat hippocampal neurons. Neurosci Lett 134:75–78.
- **Inoue M, Harada K, Matsuoka H, Warashina A.** (2010) Paracrine role of GABA in adrenal chromaffin cells. Cell Mol Neurobiol 30: 1217–1224.
- **Irwin R, Allen C.** (2009) GABAergic signaling induces divergent neuronal Ca²⁺ responses in the suprachiasmatic nucleus network. Eur J Neurosci 30:1462–1475
- **Iwasa K, Oomori Y, Tanaka H.** (1998) Gamma aminobutyric acid immunoreactivity in the mouse adrenal gland during postnatal de- velopment. Arch Histol Cytol 61:373–382.
- Jang I-S, Jeong H-J, Katsurabayashi S, Akaike N. (2002) Functional roles of presynaptic GABA_A receptors on glycinergic nerve termi- nals in the rat spinal cord. J Physiol 541:423–434.
- **Johansson S, Druzin M, Haage D, Wang M. (**2001) The functional role of a bicuculline-sensitive Ca²⁺activated K⁺ current in rat me- dial preoptic neurons. J Physiol 532:625–635.
- Kahle K, Rinehart J, Lifton R. (2010) Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1802:1150–1158.
- **Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish M, Iijima T.** (1997) Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synap- tic transmission in rat adrenal medulla. Jpn J Physiol 47:449–464.
- Kanaka C, Ohno K, Okabe A, Kuriyama K, Itoh T, Fukuda A, Sato K. (2001). The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. Neuroscience 104: 933–46.
- Kataoka Y, Gutman Y, Guidotti A, Panula P, Wroblewski J, Cosenza-Murphy D, JY W, Costa E (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci 81:3218–3222.
- Kataoka Y, Fujimoto M, Alho H, Guidotti A, Geffard M, Kelly GD, Hanbauer I. (1986) Intrinsic gamma aminobutyric acid receptors modulate the release of catecholamine from canine adrenal gland in situ. J Pharmacol Exp Ther 239:584–590
- **Kato K, Nakagawa C, Murabayashi H, Oomori Y**. (2014) Expression and distribution of GABA and GABA B-receptor in the rat adrenal gland. J Anat 224:207–215.
- **Kidokoro Y, Ritchie A.** (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal me- dulla. J Physiol 307:199–216.
- Kim B, Cho J, Choi I, Lee M, Jang I. (2011). Modulation of presynaptic GABA(A) receptors by endogenous neurosteroids. Br J Pharmacol 164: 1698–1710.

- **Kitayama S, Koyama Y, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A.** (1986). Increase in Catecholamine Release and 45Ca2+ Uptake Induced by GABA in Cultured Bovine Adrenal Chromaffin Cells. Eur J Pharmacol 131: 145–47.
- **Kitayama S, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A.** (1990) Enhancement by GABA of the stimulationevoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 341, 414–418.
- Kowalczyk P, Kulig K. (2014) GABA system as a target for new drugs. Curr Med Chem 21:3294– 3309.
- **Kyrozis A, Reichling D.** (1995). Perforated-patch recording with gramicidin avoids artifactual changes in intracellular chloride concentration. J Neurosci Methods 57: 27–35.
- Landsberg L, Young J. (1980). Catecholamines and the adrenal medulla. En Williams Textbook of Endocrinology, 891–965.
- Lazo-Fernandez Y, Aguilera G, Pham T, Park A, Beierwaltes W, Sutliff R, Verlander J, Pacak K, Osunkoya A, Ellis C, Kim Y, Shipley G, Wynne B, Hoover R, Sen S, Plotsky P, Wall S. (2015) Pendrin localizes to the adrenal medulla and modulates catecholamine release. Am J Physiol Endocrinol Metab 309:E534–E545.
- MacDermott A, Role L, Siegelbaum S. (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. Annu Rev Neurosci 22:443–485.
- Macdonald R, Olsen R. (1994) GABA_A receptor channels. Annu Rev Neurosci 17:569–602.
- **Malgaroli A, Meldolesi J.** (1991). [Ca2+]i oscillations from internal stores sustain exocytic secretion from the chromaffin cells of the rat. FEBS lett 283: 169–72.
- Martin del Rio R y Caballero A. (1980) Presence of gammaaminobutyric acid in rat ovary. J Neurochem 34:1584–1586.
- Matsuoka H, Harada K, Endo Y, Warashina A, Doi Y, Nakamura J, Inoue M. (2008) Molecular mechanisms supporting a paracrine role of GABA in rat adrenal medullary cells. J Physiol 586:4825–4842.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Smaili S, Caricati-Neto A, Gandía L, García A, Jurkiewicz A. (2010). Greater cytosolic and mitochondrial calcium transients in adrenal medullary slices of hypertensive, compared with normotensive rats. Eur J Pharmacol 636: 126–36.
- **Oomori Y, luchi H, Nakaya K, Tanaka H, Ishikawa K, Satoh Y, Ono K.** (1993) Gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in the mouse adrenal gland. Histochemistry 100: 203–213.
- **Oomori Y, Murabayashi H, Kuramoto H, Kawano H, Kato K, Nakagawa C, Sasaki M, Kitamura N, Ishikawa K, Tanaka K.** (2013) gamma-Aminobutyric acid B receptor immunoreactivity in the mouse adrenal medulla. Anat Rec (Hoboken) 296:971–978.
- **Oset-Gasque M, Castro E, Gonzalez M.** (1990) Mechanisms of [3H] gamma-aminobutyric acid release by chromaffin cells in primary cul- ture. J Neurosci Res 26:181–187.
- Perlman R, Chalfie M. (1977) Catecholamine release from the adrenal medulla. Capitulo 10 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- **Peters J, Lambert J, Cottrell G.** (1989). An electrophysiological investigation of the characteristics and function of GABA_A receptors on bovine adrenomedullary chromaffin cells. Pflugers Arch 415, 95–103.

- Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. J Neurosci Methods 37:15–26.
- **Rudomin P, Schmidt R.** (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. Exp Brain Res 129, 1–37.
- Sala F, Nistri A, Criado M. (2008) Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. Acta Physiol (Oxf) 192:203–212.
- Sangiah S, Borowitz J, Yim G. (1974) Actions of GABA, picrotoxin and bicuculline on adrenal medulla. Eur J Pharmacol 27: 130–135.
- **Sarup A, Larsson O, Schousboe A.** (2003) GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2:269–277.
- Schäfer E. (1895) Address in physiology on internal secretions. Capitulo 9 en: Williams Textbook of Endocrinology. 8th edition. Wilson J, Foster D. Saunders Company, 1992.
- Segura-Chama P, López-Bistrain P, Pérez-Armendáriz EM, Jiménez-Pérez N, Millán-Aldaco D, Hernández-Cruz A. (2015) Enhanced Ca(²⁺)-induced Ca(²⁺) release from intracellular stores contributes to catecholamine hypersecretion in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats. Pflugers Arch 467: 2307–2323.
- **Staley K, Smith R, Schaack J, Wilcox C, Jentsch T.** (1996) Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. Neuron 17: 543–551.
- **Stell B, Mody I.** (2002) Receptors with different affinities mediate phasic and tonic GABA_A conductances in hippocampal neurons. J. Neurosci. 22, RC223.
- **Tipton K.** (1973). BIOCHEMICAL ASPECTS OF MONOAMINE OXIDASE. British Medical Bulletin 29: 116–19.
- Valeeva G, Tressard T, Mukhtarov M, Baude A, Khazipov R. (2016) An optogenetic approach for investigation of excitatory and inhibitory network GABA actions in mice expressing channelrhodopsin- 2 in GABAergic neurons. J Neurosci 36:5961–5973.
- Verdugo D. (2005) Médula suprarrenal. Capítulo 50 en: "Fisiología Médica". Drucker C. Editorial El Manual Moderno, México.
- Viveros O, Wilson S, Chang K. (1982) Regulation of synthesis and secretion of enkephalins and related peptides in adrenomedullary Chromaffin cells and human pheochromocytoma. In: Costa E., Trabucchi M., eds. Regulatory Peptides: From Molecular Biology to function. New York: Raven, 217-224.
- **Winkler H, Westhead E.** (1980) The molecular organization of adrenal chromaffin granules. Neuroscience; 5(11):1803-23.
- Xie Z, Currie K, Cahill A, Fox A. (2003) Role of Cl⁻ co-transporters in the excitation produced by GABA_A receptors in juvenile bovine adrenal chromaffin cells. J Neurophysiol 90, 3828–3837.
- Zhang S, Jackson M (1993) GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. Science 259:531–534.
- **Zilberter M.** (2016) Reality of inhibitory GABA in neonatal brain: time to rewrite the textbooks? J Neurosci 36:10242–10244.

SIGNALING AND CELL PHYSIOLOGY



Modulation of spontaneous intracellular Ca^{2+} fluctuations and spontaneous cholinergic transmission in rat chromaffin cells in situ by endogenous GABA acting on GABA_A receptors

Alejandre-García Tzitzitlini¹ · Segura-Chama Pedro^{2,3} · Pérez-Armendáriz E. Martha⁴ · Delgado-Lezama Rodolfo⁵ · Hernández-Cruz Arturo^{1,2}

Received: 9 July 2015 / Revised: 21 September 2015 / Accepted: 4 October 2015 / Published online: 21 October 2015 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Using fluorescence $[Ca^{2+}]_i$ imaging in rat adrenal slices, we characterized the effects of agonists and antagonists of the GABA_A receptor (GABA_A-R) on resting intracellular $Ca^{2+}([Ca^{2+}]_i)$ and spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations (SCFs) in hundreds of individual chromaffin cells (CCs) recorded simultaneously in situ. Muscimol, a GABAA-R agonist (20 µM; 25 s), induced an increase of resting $[Ca^{2+}]_i$ in 43±3 % of CCs, a decrease in 26 ± 2 %, and no response in 30 ± 5 %. In Ca²⁺-free external medium, SCFs ceased completely and muscimol failed to elicit [Ca²⁺]; rises. All muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ changes were blocked by the GABA_A-R antagonist bicuculline, suggesting that they result from changes in membrane potential depending on the cell's Cl⁻ equilibrium potential. Unexpectedly, bicuculline increased the amplitude and frequency of SCFs in 54 % of CCs, revealing a tonic inhibition of SCFs by ambient GABA acting through GABA_A-R.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00424-015-1744-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Hernández-Cruz Arturo ahernan@ifc.unam.mx

- ¹ Departamento Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria, México, D.F. C.P. 04510, México
- ² Laboratorio Nacional de Canalopatías from Instituto de Fisiología Celular, México, México
- ³ Unidad de Investigación en Medicina Experimental, México, México
- ⁴ Departamento de Biología Celular y Tisular, from Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D.F. C.P. 04510, Mexico
- ⁵ Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, from Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Ave. IPN 2508, México City, D.F., México

Mecamylamine (a specific nicotinic cholinergic blocker) decreased basal SCF activity in 18 % of CCs and inhibited bicuculline-induced SCF intensification, suggesting that spontaneous acetylcholine (ACh) release from nerve endings contributes to SCF generation in CCs in situ and that blockade of presynaptic GABA_A-Rs intensifies SCFs in part through the disinhibition of spontaneous cholinergic transmission. Electrophysiological experiments confirmed that spontaneous excitatory postsynaptic currents recorded from CCs in situ were enhanced by bicuculline. To our knowledge, this is the first description of a regulatory effect of endogenous GABA on synaptic currents and SCFs of adrenal CCs. These findings denote a novel GABA-mediated presynaptic and postsynaptic regulatory mechanism of CC activity which may participate in the control of catecholamine secretion.

Keywords Intracellular calcium \cdot Adrenal medulla gland \cdot Chromaffin cell \cdot Endogenous GABA \cdot GABA_A receptors

Introduction

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. GABA actions are mediated by either the ionotropic GABA_A receptor (GABA_A-R), permeable to Cl⁻ ions and antagonized by bicuculline [39] or the metabotropic GABA_B receptor (GABA_B-R), a G-protein coupled receptor, activated by baclofen which regulates the function of Ca²⁺ and K⁺ channels [7, 8].

The information regarding the involvement of GABA in adrenal gland function is fragmentary and contradictory: A crucial question is whether GABA is present at relevant concentrations in the adrenal microenvironment. Adrenocortical cells do not express GABA, but its presence has been demonstrated in dense core granules from noradrenaline-containing chromaffin cells (CCs) [27], suggesting corelease of catecholamines (CA) and GABA in response to physiological stimuli [24, 41–43]. In addition, GABA immunoreactivity has been reported in afferent nerve fibers of the adrenal medulla from several mammalian species [1, 34, 41], in varicose nerve fibers contacting adrenergic CCs [41, 42] and in choline acetyltransferase (ChAT)-immunoreactive nerve fibers [28, 42], suggesting corelease of acetylcholine and GABA from splanchnic nerve terminals [27, 34, 41]. Thus, GABA, originating from CCs [26] and possibly from nerve terminals, is most likely available in the adrenal medulla interstitial space. Regarding GABA actions in the adrenal gland, experiments in rat showed that intravenous injection of GABA or the GABA_A-R agonist muscimol (but not the GABA_B-R agonist baclofen) increased heart rate and blood pressure. These cardiovascular effects were antagonized by the GABAA-R antagonist bicuculline and abolished by adrenalectomy, suggesting the involvement of adrenal GABA_A-Rs [3]. Injection of GABA_A-R agonists into the canine adrenal medulla in situ increased CA concentration in the effluent blood but reduced CA secretion evoked by electrical stimulation of the splanchnic nerve [33]. Likewise, GABA infusion into the rat adrenal medulla produced a fourfold increase in CA blood concentration, a rise of intracellular Ca^{2+} concentration ([Ca^{2+}]_i) in assemblies of CCs but a reduction of synaptically evoked Ca²⁺ signals elicited by nerve stimulation [26, 40]. These data suggest that GABA_A-R activation promotes basal CA secretion [34] while inhibiting CA secretion induced by splanchnic nerve stimulation.

Rat adrenal CCs in culture fire action potentials [9] and exhibit spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations (SCFs) in the absence of any stimuli [10, 12, 13]. SCFs result from the discharge of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum to the cytoplasm [12] and trigger basal CA secretion [35]. In rat CCs in primary culture, GABA (100 µM) produces a transient membrane depolarization and a burst of action potentials, followed by inhibition of spontaneous electrical activity [10]. GABA also caused a brief $[Ca^{2+}]_i$ rise (possibly associated to the burst of action potentials) and then inhibition of SCFs in about 15 % of spontaneously active CCs. These actions were mimicked by the GABA_A-R agonist muscimol (but not by the GABA_B-R agonist baclofen) and were blocked by bicuculline [10]. GABA_A-R-mediated inhibition of both electrical activity and SCFs on CCs in vitro is inconsistent with a CA secretion increase reported both in vivo and in situ (see above). The origin for this discrepancy is unknown. It is imaginable that CCs in their natural setting are in a more physiological condition than isolated CCs in vitro, and therefore, GABA stimulation of CCs would be more truthful. This concern has not been examined directly. The present study intends to clarify the role of GABA by exploring the actions of exogenous GABAA-R agonists and endogenous GABA acting on GABAA-Rs on SCFs and spontaneous cholinergic transmission of rat CCs in situ.

Here, fluorescence $[Ca^{2+}]_i$ imaging was used to monitor changes over time from dozens of individual CCs in situ. The GABA_A-R agonist muscimol produced plateau-like raises of $[Ca^{2+}]_i$ in a subset of CCs, and $[Ca^{2+}]_i$ decreases in another subset. These $[Ca^{2+}]_i$ changes were prevented by the GABAA-R antagonist bicuculline. The nicotinic cholinergic blocker mecamylamine diminished SCF frequency, suggesting that cholinergic innervation contributes in its generation. Unexpectedly, bicuculline increased the frequency and amplitude of SCFs, unveiling a GABAA-R-mediated tonic inhibition of SCFs by ambient GABA. Bicuculline actions could comprise changes in CCs excitability and relief of tonic inhibition by presynaptic GABA_A-Rs of spontaneous cholinergic transmission. Electrophysiological recordings in situ confirmed that bicuculline increased the amplitude and frequency of spontaneous cholinergic excitatory currents in CCs. This is the first description of a presynaptic GABAA-R-mediated regulation of spontaneous activity of CCs in intact mammalian adrenal gland. GABA_A-R activation can inhibit SCF activity presynaptically by reducing acetylcholine (ACh) spontaneous release or postsynaptically, by reducing CC excitability through membrane resistance shunting. Fluctuations of ambient GABA levels in the adrenal gland tissue, likely produced under different physiological conditions, can conceivably fine-tune the level of tonic inhibition of chromaffin cell activity and ultimately of catecholamine secretion.

Methods

Preparation of rat adrenal slices Adult male Wistar rats (8 weeks old) were sacrificed by cervical dislocation, and their adrenal glands were removed and immersed in ice-cold, low Ca^{2+} bicarbonate-buffered saline (LCBBS) containing (in mM): 140 NaCl, 2 KCl, 0.1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose and bubbled with 95 % O₂ and 5 % CO₂. Glands were trimmed of excess fat and embedded in 3 % low gelling point agarose in LCBBS. The agar block gelled on ice was glued to the tissue stand of a vibrating blade microtome (Leica VT-1000S) with the slicing chamber filled with ice-cold LCBBS. Glands were sectioned into slices 200 µm thick and kept in LCBBS at room temperature until recording. Experiments were performed up to 6 h after slice preparation.

Intracellular $[Ca^{2+}]_i$ **imaging** An adrenal slice, adhered to a glass coverslip coated with 0.3 % poly-L-lysine (Sigma; St. Louis, MO), was incubated for 35 min at room temperature with the Ca²⁺ indicator fluo-4 AM (Invitrogen, Life Sciences, Carlsbad, CA) dissolved in physiological BBS (PBBS) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose, saturated with 95 % O₂/5 % CO₂ (final dye concentration 20 μ M, with 0.5 % pluronic acid). Then, the coverslip was washed twice and secured to the

bottom of a Plexiglas chamber on the stage of an upright microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan). PBBS was continuously perfused (2 ml/min) into the recording chamber by a gravity-fed system. All experiments were performed at room temperature (22-25 °C).

The adrenal slice was viewed with a water immersion Nikon objective ($20\times$, 0.5 NA), and images were taken from an 800 by 600 µm field of view centered on the medullae. Fluo-4 was excited with 488 nm monochromatic light transmitted through fiber optics into the microscope (Polychrome V, Illumination System, TILL Photonics). Emitted fluorescence was bandpassed with a Nikon B-2E/C filter set, and series of fluorescence images (movies) were acquired (15-ms exposure; 330ms interval) with a cooled digital CCD camera (Imago QE, TILL Photonics) under protocols written in TILL vision software 4.0. Movies of 180 s in duration "episodes" were obtained. An experimental run comprised of four to six such episodes plus pauses, with a total recording time of about 20-30 min. Image sequences were saved in multi-tiff format and analyzed with ImageJ 1.38 macros (National Institutes of Health). Fluo-4 fluorescence is a function of dye concentration, illumination pathway, and [Ca²⁺]_i. Here, only fluorescence changes related to $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations were significant. Since fluo-4 does not penetrate deeper than 40-50 µm into the slice [17], only two to three layers of fluo-4-loaded cells are visible underneath the surface. Raw movies were converted to ΔF movies: $\Delta F = F_i - F_0$, where F_0 is the average image from the first five frames of the sequence, and F_i represents each (i) fluorescence image of the set. ΔF values are expressed as arbitrary units (a.u.).

Image analysis The slice was continuously perfused (2 ml/ min) with PBBS. Since the common outlet of a local perfusion system was placed within 50 µm from the border of the slice, complete replacement of the cell surroundings occurred within ~200 ms. Some episodes were either baseline controls or recovery after drug washout, while GABAA agonists and antagonist, alone or in combination with other drugs, were applied during other episodes. During the last episode, a high- K^{+} solution containing (in mM) 50 KCl, 77.5 NaCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose; pH 7.4 (HKBBS) was introduced into the perfusion chamber to quickly depolarize CCs, allow Ca²⁺ influx through voltage-gated Ca²⁺ channels, and disclose all healthy CCs. From the image stack corresponding to the first 30 s of high-K⁺ application, a "standard deviation" (SD) image was calculated (stack projection function; standard deviation algorithm; ImageJ 1.38). Here, high pixel values correspond to cells with large ΔF changes. Regions of interest (ROIs) were drawn on objects with SD values $>5\pm0.5$ and copied onto the ΔF movie stack for quantification of mean ΔF over time ($\Delta F_{(t)}$). Using this method, $\Delta F_{(t)}$ data over time from 200 individual CCs or more were readily obtained with the multi-measure ImageJ routine. A multi-cell $\Delta F_{(t)}$ plot (generated with an Igor Pro 5.03 macro; Wavemetrics Inc, Oregon, USA) conveniently displays this large amount of data (see Fig. 2a). Once the total number of responding CCs in the field was obtained, the percentages of spontaneously active and inactive CCs, and the ratio of active/ silent cells were obtained. CCs were considered as "spontaneously active" or "responsive" when ΔF increased by more than twice the SD of the noise.

Recording of action potential and after-hyperpolarization (AHP) from CCs in situ An adrenal slice was placed in a Plexiglas chamber mounted on the stage of an upright microscope (Nikon Eclipse FN1, Tokyo, Japan) and continuously perfused (2 ml/min) with PBBS. Patch pipettes, made from borosilicate glass (World Precision Instruments, Inc. USA) with a P-97 puller (Sutter Instruments; Novato CA, USA), had a 3–5 M Ω resistance when filled with a solution containing (in mM): 140 K-gluconate, 2 MgCl₂, 1.1 EGTA, 5 HEPES, pH 7.2 with KOH. Recordings were performed with the perforated patch clamp technique [44] using an pipette solution containing 50-100 ng/ml amphotericin B (Sigma; St. Louis, MO) prepared fresh every 2 h. Amphotericin B was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, MO) and stored at -20 °C in stock aliquots (50 µg/ml). To allow membrane sealing, the tip was briefly immersed in clean pipette solution and then the pipette was back-filled with amphotericin B-containing solution. The patch pipette was placed in contact with the cell with the aid of a MPC-200 micromanipulator (Sutter Instruments). Electrophysiological recordings started when the access resistance decreased below 20 M Ω [44]. Stimulation and data acquisition (5 kHz sampling rate; filtered at 1 kHz) were performed with an EPC-10 amplifier and the PatchMaster software (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany). Access resistance was compensated by 80 % and monitored throughout the experiment. Recordings were discontinued when leak current reached >25 pA or seal resistance <1 G Ω . Once in the perforated patch configuration, we switched to current-clamp mode and membrane potential was recorded. If needed, a small hyperpolarizing current was injected to maintain the resting membrane potential at~-60 mV. Single action potentials were elicited by injection of brief depolarizing current steps (7 ms; 10-20 pA).

Recording of excitatory postsynaptic currents Experiments were performed on CCs in situ in the whole-cell voltage-clamp configuration with a pipette solution containing (in mM): 10 NaCl, 100 CsCl, 20 TEACl, 5 ATPMg, 1.1 EGTA, 5 HEPES, 2 MgCl₂, pH 7.2 with CsOH, This solution effectively blocks K⁺ channels, whose spontaneous opening contributes significantly to membrane noise. Membrane potential was held at -80 mV to record spontaneous excitatory postsynaptic currents (EPSCs).

Off-line data analysis was performed with the Online Analysis application of PatchMaster software and the MiniAnalysis software (Synaptosoft, Leonia, NJ).

Reagents and drugs Salts, agarose, poly-L-lysine, DMSO, amphotericin B, muscimol, bicuculline-methiodide, bicuculline as free base, gabazine, picrotoxin, and mecamyl-amine were purchased from Sigma (St. Louis, MO); fluo-4 AM and pluronic acid were purchased from Invitrogen, Life Sciences (Carlsbad, CA).

Statistical analysis Data were expressed as either mean \pm S.E.M. (Student's *t* test used to determine statistical significance between means) or median with interquartile range (IQR) (Wilcoxon signed-rank test). The statistical significance was established at p < 0.05.

Results

Ca²⁺ imaging recordings from CCs in adrenal medulla slices Figure 1a exemplifies a SD image (peak of the high K⁺induced Ca²⁺ entry) from the central region of an adrenal medulla slice. The multi-cell $\Delta F_{(t)}$ plot shown in Fig. 1b summarizes the responses of 20 CCs, identified by numbers in Fig. 1a. Figure 1c shows six sequential snapshots of cell #11 taken before and during high-K⁺ application. The depolarization-induced Ca²⁺ transient shown above was obtained by measuring the mean $\Delta F_{(t)}$ over time from this ROI (see Methods).

Effects of the GABA_A-R agonist muscimol on resting [Ca²⁺]_i and SCFs from CCs in situ SCFs either single "spikes" or plateau-like rises with fast spikes superimposed occur randomly among the population of CCs, with considerable variation in frequency and amplitude. The multi-cell $\Delta F_{(t)}$ plot in Fig. 1d summarizes CC activity recorded from a single slice. First, the control baseline activity was recorded, and then, the GABAA-R agonist muscimol (20 µM, 25 s) was introduced into the bath, triggering elevations of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in a subset of CCs. Baseline activity was recorded again, and finally, a high- K^+ solution was perfused (25 s) to elicit voltage-gated $[Ca^{2+}]_i$ increases. Of all healthy CCs (defined by a [Ca²⁺]; increase in response to high K⁺), 53 ± 4 % showed SCFs, while 47 ± 4 % of them were inactive or "silent" (n=6 adrenal slices from six different rats). This proportion of active versus silent cells is consistent with previous reports on cultured rat CCs [10, 12, 13]. Muscimol application increased $[Ca^{2+}]_i$ in 44±3 % (mean±SE) of CC cells, while 26±2 % showed a small decrease, and the remaining 30 ± 5 % were unresponsive (*n*=6 adrenal slices from six different rats). Figure 1e exemplifies the Ca^{2+} signaling patterns observed. It has been reported that GABA or muscimol produced a brief $[Ca^{2+}]_i$ rise and then inhibition of SCFs in rat CCs in culture [10]. The latter effect was not observed in CCs in situ. Nonetheless, here, applications were much briefer (25 s; compared to 5–8 min) and the concentration used was lower (20 vs. 100 μ M).

To find out if muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases involved transmembrane Ca²⁺ influx, muscimol was tested first in the presence and then in the absence of extracellular Ca²⁺. Figure 2a summarizes this experiment: First, baseline activity was recorded and then muscimol was applied (20 μ M; 25 s) producing [Ca²⁺], rises in 43 ± 2 % of CCs and small decreases in 23 ± 4 %. The remaining $35\pm6\%$ of CCs were unresponsive (n=5 adrenal slices from five different rats). In Ca^{2+} -free saline, muscimol (20 μ M; 25 s) was unable to elicit $[Ca^{2+}]_i$ rises and SCFs, which were present in $53\pm5\%$ of CCs, ceased completely. After Ca²⁺-containing saline was restored, SCFs reappeared, suggesting a requirement of external Ca²⁺ [13]. Figure 2b exemplifies recordings obtained from two CCs: a CC showing spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations (upper trace) and another one showing no spontaneous activity (lower trace). In both cases, muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rises were abolished in Ca²⁺-free saline. In cultured bovine CCs, GABA, acting through GABA_A-Rs, also produced [Ca²⁺]_i rises which required external Ca²⁺ and were inhibited by nifedipine, implying the participation of voltage-gated L-type Ca²⁺ channels [36].

Bicuculline blocks muscimol-induced [Ca²⁺]; changes and increases SCF activity Different cell types coexist in the adrenal slice where electrical, synaptic, autocrine, and paracrine interactions are well-preserved [5, 32]. To confirm that muscimoldependent [Ca²⁺]_i changes result from the selective activation of GABAA-Rs, its effects were tested with and without bicuculline (a selective GABA_A-R antagonist) present. Both bicucullinemethiodide and bicuculline as free base were employed. Figure 3a summarizes these experiments: First, baseline activity was recorded, and then, muscimol (20 µM; 25 s) was applied. Muscimol increased $[Ca^{2+}]_i$ in 44±3 % of CCs and diminished $[Ca^{2+}]_i$ in 26±2 %. After muscimol washout, muscimol was reapplied but in the presence of 50 µM bicuculline. Clearly, bicuculline completely obliterated muscimol-induced [Ca²⁺]_i increases. Diminished muscimol effects were not due to desensitization, since CCs exposed to two identical muscimol stimuli (20 µM; 25 s) separated by a 6-min interval showed comparable responses (data not shown).

Shortly after bicuculline perfusion began, the frequency and amplitude of SCFs increased, and some previously silent CCs display SCFs. (Fig. 3a). This unexpected increase of spontaneous activity continued briefly after bicuculline washout. Traces in Fig. 3b exemplify bicuculline-induced increases of frequency and amplitude of SCF in two CCs: one where muscimol had previously induced a $[Ca^{2+}]_i$ rise (upper trace) and another one where muscimol produced no $[Ca^{2+}]_i$ change (lower trace). Bicuculline increased SCF activity in



Fig. 1 Ca²⁺ imaging in adrenal medulla slices. Effects of the GABA_A-R agonist muscimol. **a** Standard deviation (SD) image obtained from the central region of the adrenal medulla at the peak of the depolarization-induced Ca²⁺ entry. *Yellow circles* indicate regions of interest (ROIs) placed over cells that increased their fluorescence by >5 a.u. These ROIs were copied to the stack of ΔF (F_i - F_0) images to obtain the mean ΔF over time values (see Methods). **b** Twenty ROIs (indicated with numbers) were selected, and their K⁺ responses are shown. ordinate: cell number, abscissae: time. Fluorescence changes ($\Delta F=F_i-F_0$) are displayed in pseudo-color according to the calibration bar on the right. **c** Consecutive frames from the CC pointed to with a *white arrow* in **a**, acquired before, during, and after high-K⁺ application. The depolarization-induced Ca²⁺ transient shown above these frames is the mean $\Delta F_{(t)}$ over time from the ROI indicated with the *yellow circle*. **d**

54 % of CCs. Similar effects were observed in five adrenal slices from five different rats. Different GABA_A-R antagonists were used (bicuculline methiodide, bicuculline as free base, picrotoxin, and gabazine). All increased the frequency and amplitude of SCFs. Supplementary Fig. S1 illustrates picrotoxin effects. Picrotoxin increased the frequency and amplitude of SCFs in 49 % of CCs in this experiment.

Multi-cell $\Delta F_{(t)}$ plot displaying the activity of 228 CCs from a single adrenal slice. This graph recapitulates four episodes: first episode: control baseline activity and spontaneous Ca²⁺ fluctuations (SCF), second episode: [Ca²⁺]_i changes induced by the application of muscimol (20 μ M; 25 s), third episode: muscimol washout, and fourth episode: [Ca²⁺]_i increases induced by the application of high K⁺ (25 s). Only cells responding to high K⁺ with an elevation of intracellular [Ca²⁺]_i (total population of healthy CCs) were included in the analysis. **e** Recordings obtained from three individual CCs to exemplify the main types of Ca²⁺ signaling patterns observed. First trace: a CC that respond to muscimol with a [Ca²⁺]_i rise. Second trace: a CC unresponsive to muscimol application. Third trace: a CC which responded to muscimol with a small [Ca²⁺]_i decrease. Percentages obtained for each pattern observed are shown to the right (*n*=5 slices)

Bicuculline effects on frequency and amplitude of SCFs The histograms of SCF frequency and amplitude respectively are shown in Fig. 3c, d. A normal test [11] revealed that the distribution of SCF frequencies or amplitudes do not conform normal distributions (p<0.0001). The resting SCF frequency ranges from 0.65 to 13.6 SCF/min; 31 % of cells display 2 SCF/min or less, and only a third of cells show >6 SCF/min (Fig. 3c). Application of bicuculline increased significantly



Fig. 2 Muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevations require extracellular Ca^{2+} . **a** Multi-cell $\Delta F_{(1)}$ plot of 201 CCs in a single slice summarizing an experiment comprising six episodes: first episode: control baseline activity; second episode: $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by the application of muscimol (20 μ M; 25 s); third episode: the slice was perfused with Ca^{2+} -free saline during the time indicated (*blue horizontal line*; 5 min); fourth episode: in the absence of external Ca^{2+} , muscimol (20 μ M, 25 s) was

the median SCF frequency; the number of cells with <2 SCF/ min decreased to 20 %, and the cells with frequencies >6 SCF/ min increased to 45 %. These results are summarized in Table 1. Bicuculline effects on the distribution of SCF amplitudes were more conspicuous (see Fig. 3d). Before bicuculline, control SCF amplitudes ranged from 0.5 to 6.2 a.u. with few CCs (12 %) producing SFCs >4 a.u. In the presence of bicuculline, the median SCF amplitude increased significantly and the distribution SCF amplitudes shifted noticeably to the right (Fig. 3d) with 73 % of CCs displaying SCF amplitudes >4 a.u.) (see Table 1).

Bicuculline blocks muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ decreases A close examination of $\Delta F_{(t)}$ recordings revealed that bicuculline also blocked muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ decreases. Figure 3e shows $\Delta F_{(t)}$ recordings superimposed from 10 CCs where muscimol induced a $[Ca^{2+}]_i$ decrease, from 1.0 ± 0.007 (baseline) to 0.34 ± 0.002 (peak decrease; mean \pm SE; ΔF = -0.66 a. u.; p<0.0001). As shown in Fig. 3f, muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ decreases were abolished by bicuculline, from 1.0 ± 0.005 (baseline) to 0.9 ± 0.005 (peak decrease; mean \pm SE; ΔF =-0.0 a. u.; p=0.3; n=4 adrenal slices from four different rats). These results confirm that muscimol effects on CCs in situ are mediated by the activation of GABA_A-Rs.

Bicuculline effects on CC AHPs Bicuculline methiodide blocks small-conductance Ca^{2+} -activated K⁺ channels (SK) in central nervous system neurons [31], and bicuculline as free

unable to elicit $[Ca^{2+}]_i$ rises. SCFs also ceased completely Fifth episode: SCF reappeared after several minutes of washout with saline containing normal Ca^{2+} . Sixth episode: depolarization-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise in response to high K⁺ perfusion. **b** Recordings obtained from a spontaneously active (*upper trace*) and silent CC (*lower trace*). In both cases, muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rises were suppressed by Ca^{2+} -free saline

base blocks both Ca²⁺-activated and voltage-gated K⁺ currents [16]. Therefore, it could be argued that bicuculline effects on spontaneous Ca²⁺ fluctuations could be due to blockade of K⁺ channels rather than inhibition of GABA_A-R. To rule out this possibility, the afterhyperpolarization (AHP) that follows an action potential (due to the opening of Ca²⁺ and voltage-dependent K⁺ channels) was recorded from CCs in situ before and after bicuculline application (50 μ M; see Fig. 4a). AHP peak amplitudes were 16.1±1 vs. 16.0±1 mV (before and after bicuculline, respectively; mean±SE; *p*>0.999; *n*=5 cells; see Fig. 4b). The percent of normalized AHP amplitude before and after bicuculline was 99.4±0.8 % (see Fig. 4c). These observations strongly suggest that bicuculline does not block K⁺ channels in adrenal CCs.

CCs with similar muscimol responses are clustered, while cells responding to bicuculline are not Early reports showed that 20 % of rat CCs are noradrenergic and 80 % adrenergic and that they form islands of homotypic cells in the adrenal medulla [52]. Given this anatomical setting, we wondered if muscimol responses are restricted to a given population of adrenal CCs. The map shown in Fig. 5 shows the position of each CC recorded, along with type of muscimol response elicited: $[Ca^{2+}]_i$ increase, decrease, or no change. In general, CCs are clustered amidst void spaces (possibly blood vessels). In addition, CCs responding to muscimol with either a $[Ca^{2+}]_i$ increase or a $[Ca^{2+}]_i$ decrease are contiguous to similarly responding cells, while CCs showing no change are randomly



Fig. 3 Bicuculline blocks muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ changes and intensifies SCF activity of CCs in situ. **a** Multi-cell $\Delta F_{(t)}$ plot of 201 individual CCs from an adrenal medulla slice. The experiment comprised six episodes: first episode: control baseline activity. Second episode: $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by the application of muscimol (20 μ M; 25 s). Third episode: After 3 min of muscimol washout, the slice was perfused with bicuculline (50 μ M) during the time indicated (*gray horizontal line*; 5 min). Fourth episode: In the presence of bicuculline, muscimol (20 μ M, 25 s) is unable to elicit $[Ca^{2+}]_i$ changes. Bicuculline also increased the frequency and amplitude of SCF. Fifth episode: bicuculline washout. Sixth episode: depolarization-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise in response to high K⁺ perfusion. **b** Recordings from two CCs. In the first one (*upper trace*), muscimol induced a $[Ca^{2+}]_i$ rise. In the other (*lower*

intermingled. A green ring designates CCs that increased SCF amplitude and frequency when exposed to bicuculline (52 % in this example): They were divided as follows: muscimol raised $[Ca^{2+}]_i$ in 29 %, muscimol decreased $[Ca^{2+}]_I$ in 16 %, and muscimol produced no change in 7 %.

trace), muscimol produced no $[Ca^{2+}]_i$ rise. In both examples, bicuculline augmented frequency and amplitude of SCFs. **c** Distribution histograms of SCF frequency (SCF/min); *black bars*: baseline activity, *red bars*: after the application of bicuculline. **d** Distribution histograms of SCF amplitudes; *black bars*: control baseline activity; *red bars*: after the application of bicuculline. Muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ decreases are blocked by bicuculline. **e** Superimposed recordings from ten selected CCs where muscimol induced a small reduction in $[Ca^{2+}]_i$. **f** These downward responses were abolished when muscimol was re-applied to the same cells in the presence of bicuculline. *Gray traces*: ten individual recordings superimposed. *Black traces*: trace resulting from averaging the ten gray traces

Tonic cholinergic synaptic input contributes to SCF generation in CCs in situ Isolated rat CCs in culture display autonomously generated SCFs [13]. Besides its intrinsic automatism, CCs in situ are exposed to autocrine, paracrine, and synaptic influences which through action potential firing can

	Frequency median (SCF/min)	P ₂₅	P ₇₅	IQR	Amplitude median (a.u.)	P ₂₅	P ₇₅	IQR
Control	3.0	1.1	5.4	4.3	2.1	1.6	2.8	1.2
Bicuculline	4.4*	2.7	6.8	4.1	4.3*	3.4	5.3	1.9

 Table 1
 Summary of bicuculline effects on frequency and amplitude of SCFs

n=4 adrenal slices form four different rats

P25 percentile 25, P75 percentile 75, IQR interquartile range

*p<0.0001 (Wilcoxon signed-rank test)

trigger SCFs directly or contribute to their generation. Spontaneous release of ACh from synaptic terminals are recorded from CCs in situ as EPSCs, which under current-clamp conditions often trigger action potentials [5]. The experiment shown in Fig. 6a evaluates the influence of spontaneous cholinergic transmission on SCF generation. Baseline, control Ca²⁺ signaling activity was recorded first, and then, nicotine was applied (5 μ M; 15 s), producing a robust [Ca²⁺]_i rise in every CC recorded. Nicotine-induced [Ca²⁺]_i increases were abolished by mecamylamine (10 µM) demonstrating the presence of neuronal-type nicotinic acetylcholine receptors [46]. Interestingly, mecamylamine also reduces reversibly the frequency of SCFs in 18±4 % of CCs. Figure 5b exemplifies two CC recordings: one where SCFs are completely inhibited by mecamylamine and another one where mecamylamine did not affect SCFs. Nicotine-induced [Ca2+]i increases were blocked by mecamylamine in both cells. This experiment clearly demonstrates that tonic cholinergic synaptic input contributes to the generation of SCFs.

Mecamylamine inhibits bicuculline-induced enhancement of SCFs in CCs The latter results lead us to determine if

bicuculline-induced SCF enhancement in CCs in situ could involve an effect on spontaneous cholinergic synaptic transmission. Figure 6c exemplifies an experiment intended to test this hypothesis. After baseline activity was recorded, bicuculline (50 µM) was perfused producing an increase in SCF activity in 45 ± 3 % of CCs. With bicuculline present, mecamylamine was then introduced, causing an immediate reduction of SCF activity in most CCs. As mecamylamine washed out, the bicuculline-induced enhancement of SCFs recovered, while the enhancement of SCFs subsided after bicuculline application ended. Figure 6d (upper trace) exemplifies a CC where mecanylamine completely stops SCFs. The lower trace illustrates another example where mecamylamine does not affect SCFs. These experiments support the hypothesis that bicuculline-induced enhancement of SCFs of CCs in situ participates a disinhibition of spontaneous cholinergic synaptic transmission, possibly by blockade of presynaptic GABA_A receptors tonically stimulated by ambient GABA. Similar results were obtained from four slices from four rats.

Bicuculline increases amplitude and frequency of spontaneous EPSCs of CCs in situ Spontaneous release of ACh



Fig. 4 Bicuculline does not affect AHPs recorded from adrenal CCs in situ. The afterhyperpolarization (AHP) that follows an action potential was recorded from CCs in situ with the perforated patch clamp technique. The membrane potential was held at -60 mV, and action potentials were triggered by the injection of brief depolarizing current pulses. **a** Action potentials recorded from the same CC before (*black trace*) and after (*red*

trace) bicuculline application are shown superimposed. The depolarizing pulse injected is shown below. *Inset*: Enlarged view of the segment indicated with a *dashed line rectangle*. **b** Plot of peak AHP amplitude before (*black circles*) and after (*red circles*) bicuculline application (n=5 CCs). **c** Percent change of normalized AHP amplitude before (*black bar*) and after (*red bar*) bicuculline application

Fig. 5 Spatial distribution of muscimol and bicuculline responses of adrenal CCs in situ. Two dimensional maps showing the position of all CCs recorded in an adrenal medulla slice. The type of muscimol response observed is indicated: red spot: [Ca²⁺]_i increase, *blue spot*: [Ca²⁺]; decrease, hollow spot: no change. CCs responding similarly to muscimol have a tendency to be clustered. Green circles: CCs responding to bicuculline with an increase in amplitude and frequency of SCFs



from synaptic terminals can be recorded in voltage-clamped CCs in the slice preparation [5]. These EPSCs are mediated by neuronal nicotinic ACh receptors since they are inhibited by the specific nicotinic receptor blocker hexamethonium [5]. The experiment illustrated in Fig. 5c suggests that the enhancement of SCFs by bicuculline could be due to the relief of inhibition of spontaneous cholinergic transmission by tonically active presynaptic GABAA-Rs. To directly test this idea, EPSCs were recorded from CCs in situ. Figure 7 exemplifies a continuous whole-cell patch-clamp current recording. The CC was clamped at -80 mV to maximize inward currents mediated by the opening of ionotropic nicotinic receptors. Under control conditions, very few spontaneous EPSCs were recorded. After 2-3 min in the presence of 50 μ M bicuculline, spontaneous EPSCs of several amplitudes began to appear, gradually increasing their frequency and amplitude. These transient inward currents represent the release of acetylcholine-containing vesicles, since they were rapidly blocked by mecamylamine. Similar results were obtained from five out of seven CCs examined in seven separate slices. To our knowledge, this is the first description of a modulatory mechanism of CC activity in the adrenal gland involving a presynaptic inhibition of cholinergic transmission by GABA.

50 µm

Discussion

Effects of the GABA_A receptor agonist muscimol on CCs in situ In immature neurons, the activation of Cl⁻-permeable GABA_A receptors is depolarizing (excitatory) because of the expression of a $Na^+-K^+-2Cl^-$ cotransporter (NKCC1) that keeps [Cl⁻]_i relatively high and Cl⁻ equilibrium potential (ECl⁻) depolarized relative to the resting membrane potential $(V_{\rm m})$ [6]. In mature neurons, GABA action becomes inhibitory because of the increased expression of the $K^+/Cl^$ cotransporter (KCC2), which lowers [Cl⁻]_i levels and keeps ECl^{-} negative relative to $V_{\rm m}$ [51]. Muscimol produces plateau-like [Ca²⁺]_i increases in ~45 % of CCs in adrenal gland slices. These $[Ca^{2+}]_i$ elevations require external Ca^{2+} ; thus, GABA_A-R activation possibly depolarizes CCs, opens voltage-dependent Ca2+ channels, and produces Ca2+ influx. Hence, in these CCs, ECl^{-} is probably positive relative to V_{m} , as in immature bovine CCs, where NKCC1 expression is high [54]. Indeed, ECl⁻ measured in rat CCs gave -38.2 mV, consistent with a [Cl⁻]_i of 33 mM [40]. For comparison, the resting membrane potential of CCs is about -60 mV.

The GABA_A-R-mediated $[Ca^{2+}]_i$ increase in CCs in situ shown here is consistent with reports of GABA-induced CA release in



Fig. 6 Effects of nicotine and mecamylamine on CCs in situ. a Multi-cell $\Delta F_{(t)}$ plot of 214 CCs recorded in an adrenal medulla slice. The experiment comprises six episodes. First episode: control, baseline activity. Second episode: Nicotine, applied when indicated by the red *line* (5 μ M; 15 s), produces a [Ca²⁺]_i increase in all CCs. *Third episode*: After washout for 3 min, and during the time indicated with a green line, mecamylamine was perfused (10 µM, 4 min). Fourth episode: In the presence of mecamylamine, nicotine application produced almost no [Ca²⁺]_i increases. Also during mecamylamine application, the frequency of SCFs decreased in 18 % of CCs. Fifth strip: As mecamylamine is washed out, SCF activity recovers. Sixth episode: depolarizationinduced $[Ca^{2+}]_i$ rise in response to high K⁺. **b** Recordings from two CCs extracted from a. Upper trace: Mecamylamine completely inhibited SCFs in this CC. Lower trace: Mecamylamine does not affect SCFs in this cell. In both examples, nicotine-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases are completely blocked by mecamylamine. Bicuculline-induced

enhancement of SFCs is inhibited by mecamylamine. **c** Multi-cell $\Delta F_{(t)}$ plot of 128 CCs in situ. The experiment comprises six episodes. *First episode*: control, baseline activity. *Second episode*: Bicuculline (50 µM) was applied continuously as indicated (*gray line*). Notice that SCF activity increased in ~45 % of CCs. *Third episode*: Still in the presence of bicuculline, mecamylamine was perfused (10 µM, 4 min; *green line*), producing a noticeable decrease of SCFs in most CCs. *Fourth episode*: As mecamylamine perfusion is discontinued, the bicuculline-induced enhancement of SCFs recuperates. *Fifth episode*: As bicuculline washes out, the enhancement of SCFs in the population of CCs subsides. *Sixth episode*: depolarization-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise in response to high K⁺. **d** Recordings from two CCs extracted from the experiment shown in **c**. *Upper trace*: Mecamylamine inhibits the bicuculline-induced enhancement of SCFs in this CC. *Lower trace*: Mecamylamine perfusion apparently does not affect SCFs in this cell

rat CCs [26]. Intriguingly, muscimol *diminishes* $[Ca^{2+}]_i$ in a different subpopulation of CCs, an effect that is also prevented by bicuculline. Presumably in these CCs, ECI^- is negative relative to

 $V_{\rm m}$ and GABA_A-R activation *hyperpolarizes* membrane potential turning off a persistent Ca²⁺ influx possibly mediated by slowly inactivating L-type Ca²⁺ channels. The lack of muscimol



Fig. 7 Effects of bicuculline and mecamylamine on spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). **a** Continuous whole-cell voltage-clamp recording from a CC in situ. The cell, which showed very few sEPSCs under control conditions, was held at -80 mV to maximize inward currents. Bath application of 50 μ M bicuculline (*purple line*) and bicuculline plus 50 μ M mecamylamine (*green line*) are indicated. **b** Expanded time scale from the segment indicated

effects on ~1/3 of CCs could result from poor expression of GABA_A-Rs. Alternatively, ECI^- could be close to V_m and muscimol produces no CI^- flux or membrane potential change (although it might significantly shunt CC membrane). The inverted polarity of GABA_A-R-mediated $[Ca^{2+}]_i$ responses of rat CCs in situ suggest a disparity of ECI^- (and GABA-_AR-mediated CI⁻ fluxes) throughout the population of adrenal CCs. It should be possible to visualize directly these differences using fluorescent intracellular CI⁻ indicators [4].

GABAA receptors involved in CC responses in situ The GABA_A-Rs present in the brain, enriched in the postsynaptic density, and responsible for the classical phasic inhibition are the α_{1-3} , α_6 , β_{2-3} , and γ_2 combinations, whereas GABAmediated tonic inhibition involves perisynaptically or extrasynaptically located δ subunit-containing GABA_A-Rs [19]. Although δ subunits typically coassemble with $\alpha 4$ or $\alpha 6$ subunits, their association with $\alpha 1$ subunits has been demonstrated in hippocampal interneurons [22]. Immunoblotting and RT-PCR experiments have established that GABAA-Rs expressed in rat CCs, contain $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 2$, and δ subunits [40]. This means that CCs can express GABAA-Rs with the "synaptic" subunit combinations $\alpha_{1/3}\beta_{2/3}\gamma_2$ and the "extrasynaptic" $\alpha_{1/3}\beta_{2/3}\delta$ subunit composition. Besides its extrasynaptic localization, δ -containing GABA_A-Rs are characterized by high affinity, less desensitization, and high Zn^{2+} blockade [20]. In cultured rat CCs, GABA_A-R-mediated Cl⁻ currents have been recorded with two different EC₅₀ for GABA (10 and 40 μ M). High-affinity, δ -containing GABA_A-Rs can contribute to as much as 50 % to the Cl⁻ current in rat CCs. From these data, a potentially significant paracrine/ autocrine (extrasynaptic) GABA action on CC function has been suggested [26, 40]. Furthermore, the plateau-like (noninactivating) [Ca²⁺]_i rises induced by muscimol (see Figs. 1d and 2b) suggest that GABAA-Rs are not saturated at the GABA

(control, resting activity). As shown in **a**, bicuculline gradually increased the frequency and amplitude of sEPSCs (**c**) expanded time scale from the indicated segment, when frequency and amplitude of sEPSCs increased most. Mecamylamine application (10 μ M: *horizontal green line*) rapidly blocked bicuculline-induced sEPSCs confirming that they result from the activation of nicotinic cholinergic receptors. **d** Expanded time scale from the segment indicated

concentration found in the adrenal tissue and that ambient GABA can recruit extrasynaptic non-desensitizing GABA_A-Rs.

Bicuculline blocks muscimol-induced [Ca²⁺]_i changes and increases SCF frequency and amplitude in CCs in situ Tonic GABAA-R stimulation by ambient GABA has been demonstrated in several areas of the central nervous system (CNS) [49]. In the CNS, high-affinity, non-desensitizing GABA_A-Rs are necessary to explain a persistent GABAergic activation, since the catabolic enzyme GABA transaminase (GABAT) and the plasma membrane GABA transporter (GAT) keep a low extracellular GABA concentration [37, 47]. Interestingly, GABAT and GAT are not expressed in the adrenal gland [40], a situation that would favor GABA spillover from release sites and extracellular GABA accumulation. Therefore, a persistent activation of GABAA-Rs in the adrenal gland is possible, more so, since rat CCs express highaffinity, δ -containing GABA_A-Rs [40]. From the [Ca²⁺]_i responses to muscimol in the adrenal tissue, it follows that endogenous GABA, acting on GABAA-Rs may depolarize, hyperpolarize, or have no effect on membrane potential. If the bicucullineinduced increase in SCF amplitude results from the interruption of GABAergic tonic inhibition of CCs, one could expect that CCs responding to muscimol with a [Ca²⁺], decrease (i.e., hyperpolarization) would increase more SCF activity. However, the bicuculline-induced SCF intensification is independent of muscimol response, suggesting that it does not necessarily involve GABAA-Rs expressed on the CC membrane. In cultured rat adrenal CCs, GABAA-R activation shunts membrane electrical resistance, hampers action potential firing, and reduces autorhythmicity thus *inhibiting* spontaneous [Ca²⁺]; oscillations [10]. For CCs in situ, one could imagine that a persistent GABA_A-R activation inhibits SCFs and that blockade of GABAA-Rs would increase CC excitability and enhance SCFs. However, the conditions in the intact tissue are considerably more intricate: For

instance, presynaptic $GABA_A$ -Rs can also regulate spontaneous ACh release and consequently SCFs in CCs as suggested by that effects of mecamylamine in the presence of bicuculline (Fig. 5).

Are bicuculline effects on spontaneous Ca^{2+} fluctuations due to blockade of K⁺ channels rather than inhibition of GABA_A-R? Recent reports indicate that bicuculline free base blocks both Ca²⁺-dependent and voltage-gated K⁺ currents [14, 16]. Thus, it could be argued that bicuculline effects on SCF are due to blockade of K⁺ channels (on nerve terminals, CCs, or both), rather than inhibition of GABA_A-R. Nonetheless, the afterhyperpolarization that follows an action potential (due to the opening of Ca²⁺ and voltage-dependent K⁺ channels) was unaffected by the same concentration of bicuculline as free base that increased SCF activity (see Fig. 4). More importantly, picrotoxin and gabazine, two GABA_A-R-specific blockers with no reported effects on K⁺ channels, also enhanced SFC frequency and amplitude (see supplementary Fig. S1).

Bicuculline-induced increase in SCF *amplitude* can be explained by blockade of tonically active *postsynaptic* GABA_A-Rs. The expected increase of CC membrane resistance would facilitate action potential generation, either by intrinsic currents or spontaneous excitatory postsynaptic potentials (sEPSP). More action potentials mean greater Ca²⁺ influx and more plentiful intracellular Ca²⁺ stores, providing the basis for larger SFCs. Conversely, the increased *frequency* of SCF could result from blockade of *presynaptic* GABA_A-Rs. Here, the suppression of a persistent GABA-_AR activation facilitates spontaneous ACh release, thus producing larger and more frequent sEPSP. The possible involvement of both presynaptic and postsynaptic mechanisms in the regulation of CC activity described here for the first time deserves further investigation.

Our results strongly suggest a possible role of a persistent activation of GABA_A-Rs by ambient GABA in adrenal CC function. A comprehensive examination of the functional implications of these findings is needed, as well as their conceivable mechanisms of regulation. For instance, there is evidence of regional differences in GABA release and uptake throughout the CNS. Also, the expression of GABA transporters and GABA_A-Rs is modulated, mediating the magnitude of ionotropic tonic currents [2, 49]. Regional and timedependent variations of extracellular GABA levels, differential expression of GABA transporters and density of GABA_A-Rs may have profound implications in the GABA_A-R-mediated regulation of CA secretion in the adrenal gland.

Do presynaptic GABA_A-Rs mediate the inhibition of spontaneous synaptic activity in adrenal CCs in situ? The modulation of neurotransmitter release by presynaptic GABA_A-Rs is well established [18, 30, 38]. Nonetheless, the effects of GABA at any given synapse are quite difficult to predict. The most important parameter, ECI^{-} is unknown in most presynaptic terminals. Moreover, GABAA-R activation can have complex effects on excitability: Both hyperpolarizing and depolarizing potential shifts can either weaken or enhance transmitter release [15]. A presynaptic role of GABAA was first established in the mammalian spinal cord [21]: Glutamate-mediated EPSPs in spinal motoneurons are depressed by a Cl⁻-dependent depolarization of primary afferent fibers, caused by activation of GABA_A-Rs [45]. GABA also inhibits the stimulated release of peptides in the posterior pituitary nerve terminals [55]. In dorsal commissural neurons, muscimol increases by fivefold the frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) while inhibiting electrically evoked IPSCs [29]. Muscimol also increases the frequency of sEPSCs in CA₃ hippocampal neurons. Presumably, here, GABA depolarizes synaptic terminals and activates voltage-gated Ca²⁺ channels causing the Ca²⁺ influx that augments spontaneous neurotransmitter release.

Our data suggests that ambient GABA binds to presynaptic GABA_A-Rs in splachnic-adrenal cholinergic terminals and maintains spontaneous ACh release and SCF in CCs tonically inhibited. To our knowledge, this is the first report of a regulatory mechanism of spontaneous activity of CCs in the adrenal gland involving presynaptic inhibition by GABA_A-Rs. The GABA_A-R-dependent reduction of synaptically mediated $[Ca^{2+}]_i$ signals in rat adrenal medulla [26] despite the fact that GABA itself facilitates basal CA secretion was attributed to membrane shunting by increased Cl⁻ conductance [40]. Nonetheless, as shown here, GABA actions also result from presynaptic inhibition of spontaneous cholinergic transmission. The effects of GABA on the evoked splanchnic-adrenal cholinergic transmission remain to be examined directly.

Is GABA a non-cholinergic synaptic modulator of catecholamine release? In addition to ACh, splanchnic terminals store opioids [48] and bioactive peptides, like the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and the vasoactive intestinal polypeptide (VIP), which are released from splanchnic nerve terminals and trigger CA release [23]. Contrary to the nicotinic receptor, which desensitizes rapidly, PACAP stimulates CCs continuously, thus allowing uninterrupted CA release under a sustained stress [50]. Both VIP and PACAP satisfy the criteria for a non-cholinergic neurotransmitter in the rat adrenal gland [53]. Since GABA triggers CA release and appears to be present in nerve fibers and cholinergic terminals [28, 41], it could also fulfill these criteria. If released synaptically, GABA probably binds to extrasynaptic GABA_A-Rs, since published electrophysiological recordings of spontaneous and evoked postsynaptic currents show no evidence of fast GABAergic synaptic transmission after the blockade of nicotinic acetylcholine receptors [5, 32].

Adrenal CCs in situ are exposed to constituents secreted from surrounding cells. Under non-stressful conditions, splachnic nerve fibers fire at low frequency, releasing enough ACh to trigger a modest secretion of catecholamines, opiates, and ATP. These neurotransmitters bind to G-protein-coupled receptors that activate signaling cascades that inhibit Ca2+ channels and decrease CA secretion [25]. During acute stress, sympathetic stimulation intensifies, producing a strong depolarization and repetitive action potentials in CCs, which relieve voltage-dependent inhibition of non-L-type channels, allowing the Ca^{2+} influx required for a strong CA release. However, even under acute stress, voltage-independent downmodulation of L-type channels persists, and unrestrained CA secretion is prevented. At high stimulation frequencies, cholinergic nicotinic receptors eventually desensitize. Nonetheless, CA secretion is maintained by PACAP, released from splachnic terminals. GABA secreted both from CCs and synaptic terminals could also contribute to maintain CA secretion, by acting on extrasynaptic GABAA-Rs. Conversely, ambient GABA, by binding to presynaptic GABA_A-Rs, could downregulate basal CA secretion by tonically inhibiting spontaneous ACh release and diminishing SCFs.

Acknowledgments Supported by grants IN222413 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), 127658, 240305, and 260866 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México and 039/2013 from Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal (SECITI). The authors wish to thank Jesús M. Hernández Guijo and Deisy Gasca-Martínez for expert advice during the early stages of this project and José Bargas, Salvador Hernández, and David García for many thoughtprovoking discussions. The authors are also deeply indebted to Dr. Nicolás Jiménez-Perez and Biol. Diana Millán-Aldaco for expert technical assistance and MVZ Claudia V. Rivera-Cerecedo for animal breeding and management. Alejandre-García T. is a student from the Ph. D. Program in Biological Sciences, National Autonomous University of México (UNAM) and a CONACyT Ph. D. fellow. This study was conducted as part of the requirements to obtain her Ph. D. Segura-Chama P was a DGAPA-UNAM postdoctoral fellow.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors have no potential conflicts of interest. Research involving animals complies with the guidelines of the Mexican Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Secretary of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-1999). All experimental protocols were approved by the Institutional Committee of Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-IFC: protocol # AHC24-141). Research does not involve human patients.

References

 Ahonen M, Joh TH, Wu JY, Happola O (1989) Immunocytochemical localization of L-glutamate decarboxylase and catecholaminesynthesizing enzymes in the retroperitoneal sympathetic tissue of the newborn rat. J Auton Nerv Syst 26:89–96. doi:10.1016/0165-1838(89)90156-2, PMID: 2566632

- Alamilla J, Perez-Burgos A, Quinto D, Aguilar-Roblero R (2014) Circadian modulation of the Cl(⁻) equilibrium potential in the rat suprachiasmatic nuclei. Biomed Res Int 2014:424982. doi:10.1155/ 2014/424982
- Amenta F, Collier WL, Erdo SL, Giuliani S, Maggi CA, Meli A (1988) GABA_A receptor sites modulating catecholamine secretion in the rat adrenal gland: evidence from 3H-muscimol autoradiography and in vivo functional studies. Pharmacology 37:394–402, PMID: 24949446
- Arosio D, Ratto GM (2014) Twenty years of fluorescence imaging of intracellular chloride. Front Cell Neurosci 8:258. doi:10.3389/ fncel.2014.00258, PMID: 25221475
- Barbara JG, Poncer JC, McKinney RA, Takeda K (1998) An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. J Neurosci Methods 80:181–189. doi:10. 1016/S0165-0270(97)00200-8, PMID: 9667391
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nat Rev Neurosci 3:728–739. doi:10. 1038/nrn920, PMID: 12209121
- Bormann J (1988) Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. Trends Neurosci 11:112–116. doi:10.1016/0166-2236(88)90156-7, PMID: 2465608
- Bowery N (1989) GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. Trends Pharmacol Sci 10:401–407. doi:10. 1016/0165-6147(89)90188-0, PMID: 2559518
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. J Physiol 263:417–439. doi:10.1113/jphysiol.1976.sp011638, PMID: 1018274
- Busik J, Nakamura M, Abe Y, Shibuya I, Kanno T (1996) Effects of GABA on spontaneous [Ca²⁺]_c dynamics and electrical properties of rat adrenal chromaffin cells. Brain Res 739:97–103. doi:10.1016/ S0006-8993(96)00814-1, PMID: 8955929
- D'Agostino RB, aPE (1973) Test for departure from normality. Empirical results for the distributions of b2 and √b1. Biometrika 60:613–622. doi:10.1093/biomet/60.3.613
- D'Andrea P, Codazzi F, Zacchetti D, Meldolesi J, Grohovaz F (1994) Oscillations of cytosolic calcium in rat chromaffin cells: dual modulation in frequency and amplitude. Biochem Biophys Res Commun 205: 1264–1269. doi:10.1006/bbrc.1994.2801, PMID: 7528499
- D'Andrea P, Zacchetti D, Meldolesi J, Grohovaz F (1993) Mechanism of [Ca²⁺]_i oscillations in rat chromaffin cells. Complex Ca⁽²⁺)-dependent regulation of a ryanodine-insensitive oscillator. J Biol Chem 268:15213–15220, PMID: 8392069
- Debarbieux F, Brunton J, Charpak S (1998) Effect of bicuculline on thalamic activity: a direct blockade of IAHP in reticularis neurons. J Neurophysiol 79:2911–2918, PMID: 9636097
- Draguhn A, Axmacher N, Kolbaev S (2008) Presynaptic ionotropic GABA receptors. Results Probl Cell Differ 44:69–85. doi:10.1007/ 400 2007 040, PMID:17609920
- Druzin M, Haage D, Johansson S (2004) Bicuculline free base blocks voltage-activated K⁺ currents in rat medial preoptic neurons. Neuropharmacology 46:285–295. doi:10.1016/j.neuropharm.2003. 09.003, PMID: 14680766
- Duran-Pasten ML, Fiordelisio-Coll T, Hernandez-Cruz A (2013) Castration-induced modifications of GnRH-elicited [Ca²⁺](i) signaling patterns in male mouse pituitary gonadotrophs in situ: studies in the acute pituitary slice preparation. Biol Reprod 88:38. doi: 10.1095/biolreprod.112.103812, PMID: 23255341
- Eccles JC, Schmidt R, Willis WD (1963) Pharmacological studies on presynaptic inhibition. J Physiol 168:500–530. doi:10.1113/ jphysiol.1963.sp007205, PMID: 14067941
- Errington AC (2014) Extrasynaptic GABA_A receptors. A brief introduction to extrasynaptic GABA_A receptors and "tonic" GABA_A receptor-mediated inhibition in physiology and disease. In:

Extrasynaptic GABA_A receptors. The receptors 27. doi:10.1007/ 978-14939-1426-5_1. Errington AC, Di Giovanni G, Crunelli V (eds) pp 1-15

- Farrant M, Nusser Z (2005) Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(_A) receptors. Nat Rev Neurosci 6:215–229. doi:10.1038/nrm1625, PMID: 15738957
- Frank KFM (1957) Presynaptic and postsynaptic inhibition of monosynaptic reflexes. Fed Proc 16:39–40
- Glykys J, Peng Z, Chandra D, Homanics GE, Houser CR, Mody I (2007) A new naturally occurring GABA(_A) receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. Nat Neurosci 10:40–48. doi:10.1038/nn1813, PMID: 17159992
- Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, Young WS, Weihe E, Lee HW, Eiden LE (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A 99:461–466. doi:10.1073/pnas.012608999, PMID: 11756684
- Harada K, Matsuoka H, Nakamura J, Fukuda M, Inoue M (2010) Storage of GABA in chromaffin granules and not in synaptic-like microvesicles in rat adrenal medullary cells. J Neurochem 114:617– 626. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06792.x, PMID: 20477909
- Hernandez A, Segura-Chama P, Albinana E, Hernandez-Cruz A, Hernandez-Guijo JM (2010) Down-modulation of Ca²⁺ channels by endogenously released ATP and opioids: from the isolated chromaffin cell to the slice of adrenal medullae. Cell Mol Neurobiol 30: 1209–1216. doi:10.1007/s10571-010-9576-y, PMID: 21080058
- Inoue M, Harada K, Matsuoka H, Warashina A (2010) Paracrine role of GABA in adrenal chromaffin cells. Cell Mol Neurobiol 30: 1217–1224. doi:10.1007/s10571-010-9569-x, PMID: 21080062
- Iwasa K, Oomori Y, Tanaka H (1998) Gamma aminobutyric acid immunoreactivity in the mouse adrenal gland during postnatal development. Arch Histol Cytol 61:373–382. doi:10.1002/ar.22697, PMID: 9862152
- Iwasa K, Oomori Y, Tanaka H (1999) Colocalization of gammaaminobutyric acid immunoreactivity and acetylcholinesterase activity in nerve fibers of the mouse adrenal gland. J Vet Med Sci 61: 631–635. doi:10.1292/jvms.61.631, PMID: 10423684
- Jang IS, Jeong HJ, Katsurabayashi S, Akaike N (2002) Functional roles of presynaptic GABA(_A) receptors on glycinergic nerve terminals in the rat spinal cord. J Physiol 541:423–434. doi:10.1113/ jphysiol.2001.016535, PMID: 12042349
- Jang IS, Jeong HJ, Akaike N (2001) Contribution of the Na-K-Cl cotransporter on GABA(_A) receptor-mediated presynaptic depolarization in excitatory nerve terminals. J Neurosci 21:5962–5972. doi:10.1016/j.brainresbull.2010.10.007, PMID: 11487619
- Johansson S, Druzin M, Haage D, Wang MD (2001) The functional role of a bicuculline-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ current in rat medial preoptic neurons. J Physiol 532:625–635. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0625e.x, PMID: 11313434
- Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish ME, Iijima T (1997) Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. Jpn J Physiol 47:449–464, PMID: 9504132
- 33. Kataoka Y, Fujimoto M, Alho H, Guidotti A, Geffard M, Kelly GD, Hanbauer I (1986) Intrinsic gamma aminobutyric acid receptors modulate the release of catecholamine from canine adrenal gland in situ. J Pharmacol Exp Ther 239:584–590, PMID: 2877086
- Kataoka Y, Gutman Y, Guidotti A, Panula P, Wroblewski J, Cosenza-Murphy D, Wu JY, Costa E (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 3218–3222. doi:10.1073/pnas.81.10.3218, PMID: 6328506
- Kidokoro Y, Ritchie AK (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. J Physiol 307:199–216. doi:10.1113/jphysiol.1980. sp013431, PMID: 7205664

- Kitayama S, Morita K, Dohi T, Tsujimoto A (1990) Enhancement by GABA of the stimulation-evoked catecholamine release from cultured bovine adrenal chromaffin cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 341:414–418. doi:10.1007/BF00176333, PMID: 2164162
- Kowalczyk P, Kulig K (2014) GABA system as a target for new drugs. Curr Med Chem 21:3294–3309. doi:10.2174/ 0929867321666140601202158, PMID: 24934345
- MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. Annu Rev Neurosci 22:443–485. doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.443, PMID: 10202545
- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABA_A receptor channels. Annu Rev Neurosci 17:569–602. doi:10.1146/annurev.ne.17. 030194.003033, PMID: 7516126
- Matsuoka H, Harada K, Endo Y, Warashina A, Doi Y, Nakamura J, Inoue M (2008) Molecular mechanisms supporting a paracrine role of GABA in rat adrenal medullary cells. J Physiol 586:4825–4842. doi:10.1113/jphysiol.2008.158709, PMID: 18755746
- Oomori Y, Iuchi H, Nakaya K, Tanaka H, Ishikawa K, Satoh Y, Ono K (1993) Gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in the mouse adrenal gland. Histochemistry 100:203–213. doi:10. 1007/BF00269093, PMID: 8244771
- Oomori Y, Murabayashi H, Kuramoto H, Kawano H, Kato K, Nakagawa C, Sasaki M, Kitamura N, Ishikawa K, Tanaka K (2013) gamma-Aminobutyric acid B receptor immunoreactivity in the mouse adrenal medulla. Anat Rec (Hoboken) 296:971–978. doi:10.1002/ar.22697, PMID: 23564738
- Oset-Gasque MJ, Castro E, Gonzalez MP (1990) Mechanisms of [3H] gamma-aminobutyric acid release by chromaffin cells in primary culture. J Neurosci Res 26:181–187. doi:10.1002/jnr.490260207, PMID: 2142223
- Rae J, Cooper K, Gates P, Watsky M (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. J Neurosci Methods 37:15–26. doi:10.1016/0165-0270(91)90017-T, PMID: 2072734
- Rudomin P, Schmidt RF (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. Exp Brain Res 129:1–37. doi:10.1007/ s002210050933, PMID: 10550500
- Sala F, Nistri A, Criado M (2008) Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. Acta Physiol (Oxf) 192:203–212. doi: 10.1111/j.1748-1716.2007.01804.x, PMID: 18005395
- Sarup A, Larsson OM, Schousboe A (2003) GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2:269–277. doi:10.2174/1568007033482788, PMID: 12871037
- Schultzberg M, Hokfelt T, Lundberg JM, Terenius L, Elfvin LG, Elde R (1978) Enkephalin-like immunoreactivity in nerve terminals in sympathetic ganglia and adrenal medulla and in adrenal medullary gland cells. Acta Physiol Scand 103:475–477. doi:10.1111/j. 1748-1716.1978.tb06243.x, PMID: 362825
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. Trends Neurosci 27:262–269. doi:10.1016/j.tins.2004. 03.005, PMID: 15111008
- Smith CB, Eiden LE (2012) Is PACAP the major neurotransmitter for stress transduction at the adrenomedullary synapse? J Mol Neurosci 48:403–412. doi:10.1007/s12031-012-9749-x, PMID: 22610912
- Staley K, Smith R, Schaack J, Wilcox C, Jentsch TJ (1996) Alteration of GABA_A receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. Neuron 17:543–551. doi:10.1016/ S0896-6273(00)80186-5, PMID: 8816717
- Verhofstad AA, Coupland RE, Parker TR, Goldstein M (1985) Immunohistochemical and biochemical study on the development

of the noradrenaline- and adrenaline-storing cells of the adrenal medulla of the rat. Cell Tissue Res 242:233–243. doi:10.1679/ aohc.52.Suppl 351, PMID: 3902244

- Wakade TD, Blank MA, Malhotra RK, Pourcho R, Wakade AR (1991) The peptide VIP is a neurotransmitter in rat adrenal medulla: physiological role in controlling catecholamine secretion. J Physiol 444:349– 362. doi:10.1113/jphysiol.1991.sp018882, PMID: 1688031
- Xie Z, Currie KP, Cahill AL, Fox AP (2003) Role of Cl⁻ cotransporters in the excitation produced by GABA_A receptors in juvenile bovine adrenal chromaffin cells. J Neurophysiol 90: 3828–3837. doi:10.1152/jn.00617.2003, PMID: 12968012
- Zhang SJ, Jackson MB (1993) GABA-activated chloride channels in secretory nerve endings. Science 259:531–534. doi:10.1126/ science.8380942, PMID: 8380942

INVITED REVIEW



GABA_A receptor: a unique modulator of excitability, Ca²⁺ signaling, and catecholamine release of rat chromaffin cells

Tzitzitlini Alejandre-García¹ · Johanna G. Peña-del Castillo¹ · Arturo Hernández-Cruz^{1,2}

Received: 18 July 2017 / Revised: 11 October 2017 / Accepted: 13 October 2017 © Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract The role of gamma-aminobutyric acid (GABA) in adrenal medulla chromaffin cell (CC) function is just beginning to unfold. GABA is stored in catecholamine (CA)-containing dense core granules and is presumably released together with CA, ATP, and opioids in response to physiological stimuli, playing an autocrine-paracrine role on CCs. The reported paradoxical "dual action" of GABAA-R activation (enhancement of CA secretion and inhibition of synaptically evoked CA release) is only one aspect of GABA's multifaceted actions. In this review, we discuss recent physiological experiments on rat CCs in situ which suggest that GABA regulation of CC function may depend on the physiological context: During nonstressful conditions, GABAA-R activation by endogenous GABA tonically inhibits acetylcholine release from splanchnic nerve terminals and decreases spontaneous Ca²⁺ fluctuations in CCs, preventing unwanted CA secretion. During intense stress, splanchnic nerve terminals release acetylcholine, which depolarizes CCs and allows the Ca²⁺ influx that triggers the release of CA and GABA. With time, CA secretion declines, due to voltage-independent inhibition of Ca2+ channels and desensitization of cholinergic nicotinic receptors. Nonetheless, acute

This article is part of the special issue on Chromaffin Cells in Pflügers Archiv—European Journal of Physiology

Arturo Hernández-Cruz ahernan@ifc.unam.mx activation of GABA_A-R is depolarizing in about 50% of CCs, and thus GABA, acting as an autocrine/paracrine mediator, could help to maintain CA exocytosis under stress. GABA_A-R activation is not excitatory in about half of CCs' population because it hyperpolarizes them or elicits no response. This percentage possibly varies, depending on functional demands, since GABA_A-R-mediated actions are determined by the intracellular chloride concentration ($[CI_i]_i$) and therefore on the activity of cation-chloride co transporters, which is functionally regulated. These findings underscore a potential importance of a novel and complex GABA-mediated regulation of CC function and of CA secretion.

Keywords Intracellular calcium \cdot Adrenal medulla gland \cdot Chromaffin cell \cdot Endogenous GABA \cdot GABAA receptors \cdot Catecholamine secretion

Introduction

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. Its actions are mediated by either inotropic GABA_A receptors (GABA_A-Rs), permeable to Cl⁻ ions and antagonized by bicuculline or by the metabotropic G-protein-coupled GABA_B receptors, activated by baclofen and which regulate cellular excitability by its actions on Ca²⁺ and K⁺ channels [9, 11]. GABA and its receptors are also found in peripheral organs, such as the intestine, gallbladder, urinary bladder, heart, blood vessels, platelets, lung, liver, kidney, knee joints, uterus, oviduct, ovary, thyroid, and pancreas [53]. Their functional role in some of these tissues is still uncertain, since GABA can act either as a neurotransmitter or as a hormone. In this review, we will focus on GABA-mediated modulation of adrenal medulla function by examining the effects of GABA_A

¹ Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito de al Investigación Científica s/n, C.P. 04510 México, D.F., México

² Laboratorio Nacional de Canalopatías, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), C.P. 04510 CDMX, México

receptor-modifying drugs on adrenal medulla chromaffin cells (CCs) using electrophysiology, $[Ca^{2+}]_i$ imaging and amperometric detection of catecholamine release. Some of the results have been communicated previously [4].

GABA_A-R-mediated actions in the adrenal medulla

When GABA or the GABA_A-R agonist muscimol (but not the GABA_B-receptor agonist baclofen) is injected intravenously in rat, both heart rate and blood pressure increase. These cardiovascular effects are abolished by adrenalectomy and prevented by injection of the GABA_A-R antagonist bicuculline, suggesting the participation of GABA_A-Rs in regulating catecholamine (CA) release [5]. Other reports of GABA effects on adrenal medulla in situ are puzzling: The injection of GABA_A-R agonists into the canine adrenal gland in situ increases CA output in the effluent blood but reduces CA secretion evoked by splanchnic nerve stimulation [37]. GABA infusion into the rat adrenal medulla increases CA blood concentration and intracellular Ca²⁺ concentration $([Ca^{2+}]_i)$ of CCs but inhibited of $[Ca^{2+}]_i$ signals elicited by nerve stimulation of the same cells [27, 42]. The role of GABA in adrenal medulla chromaffin cell (CC) function is still fragmentary and contradictory. There is no doubt that GABA is stored in large dense core granules from CAcontaining adrenal CCs [44] which suggest that it may be released together with CA, ATP, and endorphins in response to physiological stimuli [21, 43-45], possibly playing a paracrine/autocrine role [22]. The presence of GABA in splanchnic nerve terminals is more controversial: GABA immunoreactivity has been reported in afferent nerve fibers of the adrenal medulla from several mammalian species [1, 36, 43], in varicose nerve fibers contacting adrenergic CCs [44] and in choline acetyl transferase-immunoreactive nerve fibers [31, 44], suggesting co-release of acetylcholine and GABA from splanchnic nerve terminals [30, 36, 43]. However, recent reports showed no evidence of immunostaining for glutamic acid decarboxylase (GAD) or vesicular GABA transporter (VGAT) in nerve fibers entering the adrenal medulla, suggesting that GABA is not synthesized or stored in synaptic vesicles, at least in rat [22, 42]. Also, no GABA-immunoreactive nerve fibers were found making contact with CCs in rat adrenal medulla [38], in agreement with early electrophysiological studies reporting no evidence of fast GABAergic synaptic transmission onto CCs [7, 34]. The apparently contradictory effects of GABA in the adrenal medulla (enhancement of CA secretion and inhibition of synaptically evoked CA release [27, 37, 42]), have been referred to as the "dual action" of GABA_A-R activation [22]. Nonetheless, as shown below, GABAA-R regulation of CCs is even more complex. For simplicity, the effects of acute and sustained GABAA-R activation will be described separately.

Effects of brief GABA_A-R activation on rat adrenal CCs in situ

Acute application of GABA(100 µM) to rat and bovine CCs in culture produces membrane potential (V_m) depolarization and a burst of action potentials, which opens voltagedependent L-type Ca²⁺ channels and causes a transient $[Ca^{2+}]_i$ rise [13, 27, 46, 56]. These effects are mimicked by the GABA_A-R agonist muscimol (but not by the GABA_B-R agonist baclofen) and are blocked by the selective GABA_A-R antagonist bicuculline [13]. In rat adrenal slices, muscimol application transiently increases $[Ca^{2+}]_i$ in ~ 44% of CCs while 26% show a small [Ca²⁺], decrease and 30% are unresponsive [4]. The lack of effect in the latter group could be due to a deficiency of $GABA_A$ -Rs expression. Alternatively, V_m and ECI⁻could be equal, so that GABA_A-Rs activation produces neither Cl^{-} flux nor V_m change. A *drop* in resting $[Ca^{2+}]_i$ in CCs had not been reported before. It was speculated [4, 29] that in these CCs, ECI⁻ is more negative than V_m and GABA_A-Rs activation hyperpolarizes V_m, turns off action potential firing, and reduces Ca²⁺ influx through slowly inactivating L-type Ca²⁺ channels. Recent electrophysiological recordings confirmed these interpretations: muscimol can depolarize $V_{\rm m}$ and increase action potential firing or hyperpolarize V_m and stop action potential firing or produce no noticeable response (Fig. 1a1-a3). It must be pointed out that regardless of its effect on $V_{\rm m}$, GABA-induced increase of Cl⁻ conductance can cause shunting inhibition: a drop in input resistance that attenuates V_m changes in response to transmembrane current, either synaptic or auto-generated.

It is generally accepted that phasic GABA_A-Rs stimulation is excitatory in immature neurons from the central nervous system (CNS) and inhibitory in more mature ones, presumably because ECI⁻ changes from positive to negative compared to resting $V_{\rm m}$, due to the greater expression of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻(Cl⁻ influx) co-transporter NKCC1 in immature cells and of the strong developmental upregulation of the K⁺-Cl⁻(Cl⁻ efflux) co-transporter KCC2 in mature ones [8]. This view has been challenged recently [57] because the developmental switch of GABA responses from excitatory to inhibitory observed in slice preparations was not confirmed with optogenetic experiments in vivo [54]. Nonetheless, in mature neurons from the suprachiasmatic nuclei (SCN), the reversal potential of GABAergic postsynaptic currents (E_{GABA}) displays diurnal variations of about 30 mV [2], and GABAergic stimulation elicits divergent $[Ca^{2+}]_i$ responses, suggesting substantial differences of $[Cl_i]$ levels [29].

Divergent muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ and V_m changes recorded among the population of CCs [4] also suggest cell-tocell differences in *E*Cl⁻. As shown in Fig. 1b1–b3, muscimolinduced $[Ca^{2+}]_i$ elevations recorded from CCs in situ diminish substantially or disappear after incubating an adrenal slice with low [Cl⁻] saline, presumably because Cl⁻ escapes from



Fig. 1 a1–a3 Divergent $V_{\rm m}$ responses to muscimol of rat CCs in situ. Adrenal gland slices from adult male Wistar rats (200-µm thick) were perfused with physiological saline containing (in mM) 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, and 10 glucose, saturated with 95% O₂/5% CO₂. Borosilicate glass pipettes, filled with (in mM) 140 KCl, 2 MgCl₂, 1.1 EGTA, and 5 HEPES, pH 7.2; 4-6 MΩ resistance, were used. The perforating agent gramicidin (50-100 ng/ml) was used as to prevent changes of [Cl]_i. Stimulation and data acquisition were carried out with an EPC-10 amplifier. Access resistance was compensated by 80% and monitored. Once in the perforated-patch configuration, the amplifier was switched to current-clamp mode and membrane potential (V_m) recording began. Experiments were performed at room temperature. al Example of a CC where muscimol application (20 µM, 30 s) depolarizes V_m and increases action potential firing. a2 Example of a CC where muscimol hyperpolarizes $V_{\rm m}$ and stops action potential firing. a3 Example of a CC that did not respond to muscimol. Insets on the right show muscimol responses with the voltage scale expanded $5\times$. Muscimol depolarized 7 out of 16 CCs by 12 ± 2 mV, 4 CCs became hyperpolarized by about -6.5 ± 1 mV, and the remaining 5 CCs showed no change. Vm changes increased the frequency of action potential firing by 0.6 \pm 0.2 Hz or decreased by 0.2 \pm 0.04 Hz, respectively. b1–b3 Effects of low chloride perfusion on muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$

responses. An adrenal gland slice was incubated for 35 min with the Ca²⁺ indicator fluo-4 AM. Fluo-4 was excited with 488 nm light and emitted fluorescence was acquired at 520-560 nm. Fluorescence images (50 ms exposure) were acquired with a cooled digital CCD camera. Experiments comprised baseline control and application of GABAA agonists and antagonist, alone or in combination with other drugs. Finally, a solution containing 50 mM KCl was introduced to depolarize CCs and allow voltage-gated Ca²⁺ influx. Regions of interest (ROIs) were drawn on individual CCs for quantification of mean ΔF over time (for further details see [6]). b1 Control baseline activity from 158 individual CCs was recorded first, and then muscimol (20 µM; 25 s) was applied. Forty out of 158 CCs responded with a $[Ca^{2+}]_i$ increase. Then, the slice was incubated for 34 min in low-chloride saline made by substituting NaCl and KCl by 125 mM of isethionic acid (sodium salt) and 2.5 mM of D-gluconic acid (potassium salt). Still in the presence of low chloride saline, muscimol was re-applied, and only 7 out of 40 CCs continue responding with a $[Ca^{2+}]_i$ increase. $[Ca^{2+}]_i$ transients elicited by membrane depolarization with high K^+ (25 s) are shown last. b2 Example of a CC where low chloride abolished the muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase. **b3** Example of a CC where low chloride drastically reduced the amplitude of muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise (Alejandre-García et al., unpublished observations)

the cells and the cation-chloride co-transporters are unable to maintain high $[Cl_{i}]_{i}$. In bovine CCs, ECl_{i} rather positive (- 28 mV) compared to the cell's resting potential (~ - 60 mV) and NKCC1 is assumed to play a key role in regulating $[Cl_{i}]_{i}$ because it is highly expressed in bovine CCs (but not KCC2) and bumetanide (a NKCC1 blocker) inhibits muscimol-induced $[Ca^{2+}]_{i}$ elevations [56]. An interesting question is whether NKCC1 is also responsible for maintaining high $[Cl_{i}]_{i}$ in rat CCs in situ. As shown in Fig. 2a1–a3, after incubating an adrenal slice with bumetanide (20, 50, or 100 μ M; from 35 min to 7 h.), muscimol-induced $[Ca^{2+}]_{i}$ elevations remain unaffected, suggesting that NKCC1 is not the main cation-chloride co-transporter responsible for intracellular Cl⁻accumulation in rat CCs [33].

Does GABA_A-R activation trigger CA release in rat CCs?

CA secretion in adrenal CCs is tightly controlled by $[Ca^{2+}]_i$ [20] so that the magnitude of $[Ca^{2+}]_i$ elevations closely parallel the amount of CA secreted [6]. Acute activation of GABA_A-Rs rises $[Ca^{2+}]_i$ in rat CCs (see Fig. 1b2), which presumably stimulates CA exocytosis. Nonetheless, singlecell amperometry recordings must be performed to test this assumption [50]. Figure 3 demonstrates that GABA_A-R activation induces the same effects in cultured CCs than in CCs in situ, i. e., a brief muscimol application can increase, decrease, or produce no change in $[Ca^{2+}]i(a1-a4)$ and cause membrane depolarization, hyperpolarization, or no change (b1-b3). Figure 3c exemplifies amperometric recordings obtained from cultured rat CCs. While high-potassium depolarization consistently triggers a burst of amperometric spikes, muscimol application (from 20 to 100 µM) is unable to elicit CA secretion from the same cells (Fig. 3c1, c2; n = 5). These results are unexpected, because infusion of GABA into the rat adrenal medulla increases CA concentration in effluent blood [27, 42] and GABA application to bovine CCs in culture stimulates CA secretion [56]. One possible explanation is that $[Ca^{2+}]_i$ elevations induced by muscimol in cultured CCs are less efficiently coupled to CA exocytosis than those produced by high K^+ depolarization. GABA_A-R-mediated $[Ca^{2+}]_i$ transients even if they do not elicit exocytosis by themselves, if combined with other stimuli (membrane depolarization or intracellular Ca²⁺ release), should potentiate exocytosis events. This possibility remains to be examined.

Tonic GABA_A-R activation by endogenous GABA modulates spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations and action potential firing in rat adrenal CCs in situ

GABA_A-R activation by ambient GABA is a common finding in the central nervous system [51]. Since GABA transaminases (GABAT) and plasma membrane GABA transporters



Fig. 2 Bumetanide does not inhibit muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rises. Ca^{2+} signals recorded from > 300 individual CCs in a fluo-4-loaded rat adrenal gland slice previously incubated for 1 h 40 min in saline containing 100 μ M bumetanide. **a1** Control baseline activity was recorded first and then muscimol (20 μ M; 25 s) was applied and $[Ca^{2+}]_i$ changes were recorded. After muscimol and bumetanide wash-out for about

10 min, muscimol was re-applied and finally $[Ca^{2+}]_i$ transients produced by high-K⁺ depolarization (25 s) were recorded. About 42% of CCs responded to muscimol with a $[Ca^{2+}]_i$ rise. **a2** Example from a CC that responded to muscimol with a $[Ca^{2+}]_i$ rise. **a3** Example from another CC where muscimol application transiently decreased $[Ca^{2+}]_i$ (Alejandre-García et al., unpublished observations)

(GAT) keep extracellular GABA concentration low [40, 49], this GABA action usually requires the presence of highaffinity non-desensitizing GABA_A-Rs. Remarkably, GABAT and GAT are absent in the adrenal gland [42], which favors extracellular GABA accumulation but at the same time could lead to GABA_A-Rs desensitization.

Cultured rat adrenal CCs display autonomously generated spontaneous [Ca²⁺], fluctuations (SCFs), which contribute to basal CA secretion [39] and result from Ca²⁺ release from intracellular Ca²⁺ stores (mainly endoplasmic reticulum) [15, 16], rather than action potential firing, which depend on the coordinated activity of Na⁺, Ca²⁺, and K⁺ channels [55]. In the adrenal slice, CCs also display SCFs, but here, the situation is more complex, because cells are subject to autocrine, paracrine, and synaptic influences which can trigger SCFs directly and/or contribute to their generation [4, 7, 23, 34]. When adrenal medulla slices are bathed with GABAA-Rs antagonists bicuculline, picrotoxin, or gabazine as a mean to assess the actions of endogenous GABA, it is found that SCFs increase in frequency and amplitude in ~ 50% of CCs (Fig. 4a1, a2) [4]. This implies that endogenous GABA exerts a tonic inhibition of SCFs. As shown earlier, a brief muscimol application depolarizes CCs and transiently increases [Ca²⁺], and yet endogenous GABA tonically inhibits SCFs, demonstrating that GABAA-R regulation of CCs in situ is multifaceted. An important aspect to consider is that CCs in situ are influenced by cholinergic synaptic transmission [7]. The extent of this influence is demonstrated when nicotinic acetylcholine receptors are blocked. [48]. Mecamylamine, a selective nicotinic receptor blocker inhibits spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSC) and baseline SCFs. It also weakens the bicuculline-induced enhancement of SCFs observed in CCs in situ [4]. This suggests that (1) spontaneous release of acetylcholine (ACh) from synaptic terminals contributes to the production of SCFs and (2) that this synaptic influence is tonically inhibited by endogenous GABA, possibly through presynaptic GABA_A-Rs. Interestingly, cultured CCs do not exhibit the bicuculline-induced increase in frequency and amplitude of SCFs (Fig. 3a1-a4) seen in CCs in situ (Fig. 4a1, a2). This observation has two likely explanations: (1) ambient GABA accumulation is much less in culture than in the tissue slice and (2) isolated CCs are deprived of the influence of cholinergic innervation present in adrenal slices [7].

Endogenous GABA regulates CC function by acting both on pre- and postsynaptic GABA_A-Rs

It has been known for over 50 years that presynaptic GABA_A-Rs can modulate neurotransmitter release [18, 32]. Nonetheless, GABA_A-R activation can have complex effects since $EC\Gamma$ is unknown in most presynaptic terminals and both hyperpolarizing and depolarizing $V_{\rm m}$ shifts can either weaken or enhance transmitter release [17]. In dorsal commissural

neurons, and in CA₃ hippocampal neurons, muscimol increases the frequency of spontaneous inhibitory and excitatory postsynaptic currents (sIPSCs and sEPSCs, respectively) presumably because it depolarizes synaptic terminals, opens voltage-gated Ca²⁺ channels, and increases Ca²⁺ influx [32]. Conversely, in adrenal CCs in situ, endogenous GABA *inhibits* both spontaneous ACh release and SCFs [4]. GABA_A-Rs activation also inhibits ACh release from cholinergic nerve terminals in the rat's superior cervical ganglion [35].

The bicuculline-induced increase in frequency of SCFs (Fig. 4b1) probably results from the relief of presynaptic inhibition of cholinergic sEPSCs, which ordinarily trigger one or more action potentials [7]. The increase in amplitude of SCFs (Fig. 4b2) could have a different explanation: Assuming that endogenous GABA has similar effects on CCs in situ as sustained GABAA-Rs activation of CCs in vitro (shunting of membrane electrical resistance and hindering of spontaneous action potential firing [12]), blockade of GABA_A-Rs should increase membrane resistance and promote spontaneous firing of CCs [3], leading to greater Ca²⁺ influx and more plentiful intracellular Ca²⁺ stores, hence generating larger SFCs. The first part of this assumption is confirmed in Fig. 4c. Here, membrane potential is recorded under current clamp with the perforated patch technique from a CC in situ while a selective GABA_A agonist and antagonist are applied to the bath. Clearly, membrane potential depolarizes and firing of action potentials increased in the presence of the antagonist. This effect was observed in > 50% of CCs recorded.

Taken together, these physiological experiments in rat CCs in situ suggest that GABA regulates CC function differently depending on its *rate of presentation*: fast GABA_AR activation displays its "dual action," stimulation of CA secretion and inhibition of synaptically evoked CA release [22], while *persistent* activation of GABA_A-Rs causes inhibition of spontaneous ACh release from splanchnic nerve terminals and reduction of SCFs [4]. GABA can also reduce CC excitability by shunting membrane electrical resistance. Together, these latter actions tend to prevent unrestrained basal CA release.

GABA_A receptors involved in CCs responses in situ

GABA_A-Rs are pentameric assemblies of α (α 1– α 6) and β (β 1– β 3) subunits and one or more γ (γ 1– γ 3), ρ (ρ 1– ρ 3), δ , ε , or θ subunits. GABA_A-Rs expressed in rat CCs contain α 1 and α 3, β 2/3, and γ 2 or δ subunits [42]. According to a recent report, α 3 is the main subunit expressed in CCs and hence, GABA_A-Rs are likely formed by α 3, β 2/3, and γ 2 subunits [28]. The conservation of "immature" α 3 subunits in adult CCs is thought to be due to the high glucocorticoid levels present in the adrenal medulla [22]. In any case, the sustained inhibition by endogenous GABA and the plateau-like [Ca²⁺]_i rises induced by muscimol [4] suggest that at least some of



 $GABA_A$ -Rs expressed in CCs are δ -containing, nondesensitizing, and hence are neither saturated nor desensitized

at the local GABA concentration of adrenal tissue [19]. Regardless of the subunit composition, only Cl^- and HCO_3^-

Fig. 3 $[Ca^{2+}]_i$ and V_m responses to GABA_AR modulators in rat CCs in culture. **a1** $[Ca^{2+}]_i$ recordings of > 80 CCs showing responses to the application of muscimol (20 µM; 25 s; red line), bicuculline (blue line), and depolarization with high K⁺ (60 mM; black line). Similarly to CCs in situ, muscimol application increases, decreases, or yields no change in $[Ca^{2+}]_i$. **a2**-a4 Examples of $[Ca^{2+}]_i$ responses to muscimol, **a2** a CC responding with a $[Ca^{2+}]_i$ rise, **a3** a CC responding with $[Ca^{2+}]_i$ decrease, and a4 a CC showing no response. 37% of CCs presented a [Ca²⁺], rise. Notice that bicuculline did not increase the frequency nor the amplitude of SCFs. b1-b3: Perforated patch-camp Vm recordings from rat CCs in culture. Acute muscimol application produces b1 membrane depolarization and action potential firing, b2 a decline of action potential firing and a small hyperpolarization (~7 mV), and b3 no response. Insets on the right show muscimol responses with the voltage scale expanded $5\times$ (Alejandre-García et al., unpublished observations). c CA secretion elicited by muscimol application vs. membrane depolarization. Amperometric recordings were carried out as in [6]. Briefly, CCs were perfused with a solution containing (in mM) 135 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 glucose, and 15 HEPES (pH 7.3), and the carbon fiber microelectrode, maintained at + 700 mV, was placed in contact with the cell and to monitor CA release. Current recordings were obtained with an EPC-10 amplifier under voltageclamp. CCs were stimulated with a puff of either high K^+ (60 mM) or muscimol (20-100 µM).cl Example of an amperometric recording obtained from rat CCs in culture after the application of muscimol (20 μ M, 30 s) or a 5-s-long high K⁺ depolarizing pulse. c2 Mean cumulative charge over time after the application of muscimol (black squares) or high K⁺ (white squares). Only depolarization elicited a burst of amperometric spikes with a peak cumulative charge integral of $38 \pm 8 \text{ pC}$ (*n* = 5). (Peña del Castillo et al., unpublished observations)

can permeate GABA_A-Rs [10]. Several membrane transporters regulate intracellular pH either by extrusion of H⁺ or by accumulation of HCO₃⁻. Under physiological conditions, $E\text{HCO}_3^-$ is much more depolarized (~ - 10 mV) than resting $V_{\rm m}$ [47] and hence, HCO₃⁻movement through GABA_A-Rs is expected to be outward, causing $V_{\rm m}$ depolarization. Conversely, $E\text{CI}^-$ is closer to resting $V_{\rm m}$, and Cl⁻ movements can mediate either hyperpolarizing or depolarizing currents depending on the existing Cl⁻ gradient.

Regulation of a drenal medulla function by $\ensuremath{\mathsf{GABA}}_{\ensuremath{\mathsf{A}}}\ensuremath{\mathsf{R}}$ activation

Under resting, non-stressful conditions, splanchnic nerve fibers fire action potentials at low frequency of about 0.5 Hz, releasing small quantities of ACh which stimulate a mild secretion of CA, opiates, and ATP from CCs. These transmitters bind to G-protein-coupled receptors, which through signaling cascades exert autocrine/paracrine inhibition of Ca^{2+} channels and restrain further CA secretion [20, 23–25]. As discussed here, endogenous GABA, mostly originated from CCs, tonically inhibits both spontaneous cholinergic transmission and CC excitability, also preventing unnecessary CA secretion [4, 13, 20, 27, 36, 42]. During acute stress, nerve fiber action potential firing intensifies to ~ 15 Hz and large quantities of ACh are released, leading to strong depolarization and bursts of action potentials in CCs [47]. This relieves voltage-

dependent inhibition of non-L-type channels, allowing the Ca²⁺ influx needed for a vigorous CA release [20, 23, 24]. However, voltage-independent inhibition of L-type channels by G-protein-activated signaling cascades tend to prevail, and the intense synaptic stimulation causes rapid desensitization of cholinergic nicotinic receptors and hence a decline of CA exocytosis. Nonetheless, PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) released from splanchnic terminals [52] and GABA, secreted together with CA from CCs, could cooperate to maintain continuous CC stimulation and sustain CA exocytosis under acute stress.

GABA actions on CCs could be modulated by the activity of cation-chloride co-transporters?

There is evidence of regional differences in GABA release and uptake throughout the CNS. Also, the expression of GABA transporters, GABA-transaminases [49], and GABA_A-Rs subunit composition is modulated [51]. Regional and time-dependent variations of extracellular GABA levels and density of GABAA-Rs may affect regulation of CA secretion in the adrenal gland. It is plausible that the proportion of CCs responding to GABA with excitation or inhibition varies depending on how $[Cl_i]_i$ is controlled [49]. The activity of the main cation-chloride co-transporters, NKCC1 and KCC2, is modulated through a signaling cascade involving WNK (with no lysine kinase) and the kinases SPAK (STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase) and OSR1 (oxidative stress-responsive kinase 1). WNKs are allosterically modified by Cl⁻, with a decrease in $[Cl⁻]_i$ leading to WNKdependent activation of SPAK and OSR1 [33]. SPAKmediated phosphorylation of threonine residues in the Nterminal of NKCC1 results in its activation and subsequent Cl⁻ accumulation. Conversely, dephosphorylation of these residues by protein phosphatase 1(PP1) deactivates NKCC1. A reciprocal regulation of KCC2 activity by the WNK-SPAK/ OSR1cascade (inhibition by phosphorylation and activation by dephosphorylation) has been demonstrated [33]. It is important to determine if WNK regulates the activity of NKCC1 and KCC2 in CCs (Fig. 5). One should keep in mind that other mechanisms besides NKCC1 and KCC2 regulate [Cl⁻]_i, such as a the ATP-dependent Cl⁻ pump [26] or the anion-exchanger AE3, which is expressed in neurons and normally accumulates Cl^- in exchange for intracellular HCO_3^- and thereby elevates $[Cl_i]_i$ [24, 47]. Interestingly, pendrin, a member of the SLC26A family of Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers and expressed primarily in the kidney, is conspicuously expressed in adrenal CCs and can modulate CA release [41]; (see Fig. 5). Opposing GABA responses in rat individual CCs in situ [4] result from ECl^{-} being either positive or negative relative to V_{m} , possibly because the activity of NKCC1/KCC2 or other anion transporters is different (see Fig. 5). On the other hand, it is an open question if alterations of GABA regulation of CC function are



Fig. 4 a1–a2. Bicuculline blocks muscimol-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevations and enhances SCFs of CCs in situ. **a1** $[Ca^{2+}]_i$ recording from a CC where muscimol (20 μ M, 25 s) induced a $[Ca^{2+}]_i$ rise and bicuculline application obliterated such response. **a2** Recording from another CC where muscimol produced no $[Ca^{2+}]_i$ change. In both examples, bicuculline augmented both frequency and amplitude of SCFs. **b1–b2** Distribution histograms of frequency (**b1**) and amplitude (**b2**) of SCFs (500 CCs from 4 different slices) Black bars: control, baseline SFCs activity; red bars: SFCs in the presence of bicuculline. Modified from [4]. **c** Effects of a

GABA_A-R agonist and antagonist on CC excitability. Perforated patch V_m recording from a CC in situ with spontaneous action potential firing. In this example, acute application of muscimol slightly hyperpolarizes the cell (~ 6 mV) and interrupts action potential firing, while picrotoxin (100 μ M) produces a small gradual depolarization (~ 4 mV) and a marked increase in firing rate of spontaneous action potentials. Bicuculline increased the firing rate of action potentials in 6 out of 10 CCs by 0.5 ± 0.06 Hz. The remaining 4 CCs showed no effect (Alejandre-García et al., unpublished observations)

involved in abnormalities like chronic stress or dysregulation of CA secretion. Preliminary data from our laboratory revealed smaller $[Ca^{2+}]_i$ elevations recorded in response to muscimol and less bicuculline induced enhancement of SCF



Fig. 5 Factors involved in the divergent responses of rat CCs to GABA_A receptor activation Chloride accumulation largely depends on the Na⁺/K⁺/2Cl⁻ co-transporter NKCC1 which is expressed in neurons and assumed most active in CCs that respond to GABA with membrane depolarization and $[Ca^{2+}]_i$ rise. The cation-chloride co-transporter KCC2 which extrudes Cl⁻ out of the cell is also illustrated. The scheme

also represents the anion-exchanger AE3, which accumulates CI^- in exchange for intracellular HCO_3^- . Pendrin, a kidney CI^-/HCO_3^- exchanger that is also expressed in CCs could participate in CI^- transport. The reciprocal regulation of NKCC1 and KCC2 could be one of the reasons for the differences in $[C\Gamma]_i$. VDDC voltage-dependent calcium channel

in adrenal CCs from spontaneously hypertensive rats, possibly suggesting a weaker GABAergic modulation (Alejandre-García et al., unpublished observations).

Conclusion

Unrestrained release of CAs by CCs could lead to hypertensive crisis, arrhythmias, and even heart failure. Also, inappropriate response to acute or chronic stress can be detrimental. Therefore, fine control of chromaffin cell secretion is essential for normal physiological function and proper stress response. Materials secreted by CCs can either downregulate or upregulate CA exocytosis: Autoreceptors for ATP (P2Y receptors), CA (α -adrenergic receptors), and enkephalin (μ -opioid receptors) couple to Gi-type G-proteins and inhibit Ca²⁺ channels and transmitter release. Conversely, D1 dopamine and β -adrenergic receptors augment CA release by increasing Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels or phosphorylating the exocytotic machinery [14]. The physiological findings discussed in this review illustrate the importance of this novel and complex GABA_A-R-mediated regulatory mechanism that constitutes another layer of control of the activity of CCs in situ and hence, on the regulation of CA exocytosis, which deserves further exploration.

Acknowledgements The authors wish to thank Dr. María Chávez Canales for helpful discussions and expert advice. The authors are also indebted to Nicolás Jiménez-Perez, Diana Millán-Aldaco, Arturo Picones Medina, and Ruth Rincón-Heredia for technical assistance and MVZ Claudia V. Rivera-Cerecedo for animal breeding and management. Alejandre-García T. and Peña del Castillo J. G. are Ph.D. students from the Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas and Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, respectively, of the Universidad Nacional Autonóma deMéxico (UNAM) and CONACyT Ph.D. fellows. This study was conducted as part of the Program's requirements to obtain their Ph.D.

Funding information The study is supported by grants 279820 (Laboratorio Nacional de Canalopatías) and CB 240305 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México), PAPIIT IN211616 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), and 039/2013 from Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal (SECITI).

Compliance with ethical standards Research involving animals complies with the guidelines of the Mexican Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Secretary of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00–1999). All experimental protocols were approved by the Institutional Committee of Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-IFC: protocol # AHC24-141). Research does not involve human patients.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Abbreviations *GABA*, gamma-aminobutyric acid (); *GABA_A-Rs*, GABA_A receptors; *GABA_B-R*, GABA_B receptors; *CA*, catecholamine;

 $[Ca^{2+}]_i$, intracellular Ca²⁺ concentration; $[C\Gamma]_i$, intracellular chloride concentration; *CCs*, adrenal medulla chromaffin cells; *SCFs*, spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations; V_m , membrane potential

References

- Ahonen M, Joh TH, JY W, Häppölä O (1989) Immunocytochemical localization of L-glutamate decarboxylase and catecholaminesynthesizing enzymes in the retroperitoneal sympathetic tissue of the newborn rat. J Auton Nerv Syst 26:89–96
- Alamilla J, Perez-Burgos A, Quinto D, Aguilar-Roblero R (2014) Circadian modulation of the Cl(–) equilibrium potential in the rat suprachiasmatic nuclei. Biomed Res Int 2014:424982. https://doi. org/10.1155/2014/424982
- Albiñana E, Segura-Chama P, Baraibar AM, Hernández-Cruz A, Hernández-Guijo JM (2015) Different contributions of calcium channel subtypes to electrical excitability of chromaffin cells in rat adrenal slices. J Neurochem 133:511–521. https://doi.org/10. 1111/jnc.13055
- Alejandre García T, Segura Chama P, Pérez Armendáriz ME, Delgado Lezama R, Hernández Cruz A (2016) Modulation of spontaneous intracellular Ca2+ fluctuations and spontaneous cholinergic transmission in rat chromaffin cells in situ by endogenous GABA acting on GABAA receptors. Pflugers Arch Eur J Physiol 468:351–365. https://doi.org/10.1007/s00424-015-1744-y
- Amenta F, Collier WL, Erdö SL, Giuliani S, Maggi CA, Meli A (1988) GABAA receptor sites modulating catecholamine secretion in the rat adrenal gland: evidence from 3H-muscimol autoradiography and in vivo functional studies. Pharmacology 37:394–402. https://doi.org/10.1159/000138494
- Augustine GJ, Neher E (1992) Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. J Physiol 450:247–271. https://doi.org/ 10.1113/jphysiol.1992.sp019126
- Barbara J-G, Christophe Poncer J, Anne McKinney R, Takeda K (1998) An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. J Neurosci Methods 80:181–189. https://doi.org/10.1016/S0165-0270(97)00200-8
- Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. Physiol Rev 87:1215–1284. https://doi.org/ 10.1152/physrev.00017.2006
- Bormann J (1988) Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. Trends Neurosci 11:112–116. https://doi.org/ 10.1016/0166-2236(88)90156-7
- Bormann J, Hamill OP, Sakmann B (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gammaaminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. J Physiol 385:243–286. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1987.sp016493
- Bowery N (1989) GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. Trends Pharmacol Sci 10:401–407. https:// doi.org/10.1016/0165-6147(89)90188-0
- Brandt BL, Hagiwara S, Kidokoro Y, Miyazaki S (1976) Action potentials in the rat chromaffin cell and effects of acetylcholine. J Physiol 263:417–439. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976. sp011638
- Busik J, Nakamura M, Abe Y, Shibuya I, Kanno T (1996) Effects of GABA on spontaneous [Ca2+]c dynamics and electrical properties of rat adrenal chromaffin cells. Brain Res 739:97–103. https://doi. org/10.1016/S0006-8993(96)00814-1
- Currie KPM (2010) Inhibition of Ca2+ channels and adrenal catecholamine release by G protein coupled receptors. Cell Mol Neurobiol 30(8):1201. https://doi.org/10.1007/s10571-010-9596-7
- D'Andrea P, Zacchetti D, Meldolesi J, Grohovaz F (1993) Mechanism of [Ca2+]i oscillations in rat chromaffin cells.

Complex Ca(2+)-dependent regulation of a ryanodine-insensitive oscillator. J Biol Chem 268:15213–15220

- D'Andrea P, Codazzi F, Zacchetti D, Meldolesi J, Grohovaz F (1994) Oscillations of cytosolic calcium in rat chromaffin cells: dual modulation in frequency and amplitude. Biochem Biophys Res Commun 205:1264–1269. https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2801
- Draguhn A, Axmacher N, Kolbaev S (2008) Presynaptic ionotropic GABA receptors. In: Inhib. Regul. Excit. Neurotransmission. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 69–85
- Eccles JC, Schmidt R, Willis WD (1963) Pharmacological studies on presynaptic inhibition. J Physiol 168:500–530. https://doi.org/ 10.1113/jphysiol.1963.sp007205
- Errington AC (2014) Extrasynaptic GABAA receptors. In: Extrasynaptic GABAA recept. Springer New York, New York, pp 1–14
- García AG, García-De-Diego AM, Gandía L, Borges R, García-Sancho J (2006) Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. Physiol Rev 86:1093–1131. https://doi.org/10.1152/ physrev.00039.2005
- Harada K, Matsuoka H, Nakamura J, Fukuda M, Inoue M (2010) Storage of GABA in chromaffin granules and not in synaptic-like microvesicles in rat adrenal medullary cells. J Neurochem 114:617– 626. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06792.x
- Harada K, Matsuoka H, Fujihara H, Ueta Y, Yanagawa Y (2016) GABA signaling and neuroactive steroids in adrenal medullary chromaffin cells. Front Cell Neurosci 10:1–11. https://doi.org/10. 3389/fncel.2016.00100
- Hernández A, Segura-Chama P, Albiñana E, Hernández-Cruz A, Hernández-Guijo JM (2010) Down-modulation of Ca2+ channels by endogenously released ATP and opioids: from the isolated chromaffin cell to the slice of adrenal medullae. Cell Mol Neurobiol 30: 1209–1216. https://doi.org/10.1007/s10571-010-9576-y
- Hernández A, Segura-Chama P, Jiménez N, García AG, Hernández-Guijo JM, Hernández-Cruz A (2011) Modulation by endogenously released ATP and opioids of chromaffin cell calcium channels in mouse adrenal slices. Am J Phys Cell Phys 300:C610– C623. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00380.2010
- Hernández-Guijo JM, Carabelli V, Gandía L, García AG, Carbone E (1999) Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells. Eur J Neurosci 11:3574–3584. https://doi.org/10.1046/ j.1460-9568.1999.00775.x
- Inoue M, Hara M, Zeng X-T, Hirose T, Ohnishi S, Yasukura T, Uriu T, Omori K, Minato A, Inagaki C (1991) An ATP-driven Cl– pump regulates Cl– concentrations in rat hippocampal neurons. Neurosci Lett 134:75–78. https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90512-R
- Inoue M, Harada K, Matsuoka H, Warashina A (2010) Paracrine role of GABA in adrenal chromaffin cells. Cell Mol Neurobiol 30: 1217–1224. https://doi.org/10.1007/s10571-010-9569-x
- Inoue M, Harada K, Nakamura J, Matsuoka H (2013) Regulation of α3-containing GABAA receptors in guinea-pig adrenal medullary cells by adrenal steroids. Neuroscience 253:245–255. https://doi. org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.046
- Irwin RP, Allen CN (2009) GABAergic signaling induces divergent neuronal Ca2+ responses in the suprachiasmatic nucleus network. Eur J Neurosci 30:1462–1475. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568. 2009.06944.x
- Iwasa K, Oomori Y, Tanaka H (1998) Gamma aminobutyric acid immunoreactivity in the mouse adrenal gland during postnatal development. Arch Histol Cytol 61:373–382. https://doi.org/10.1679/ aohc.61.373
- 31. Iwasa K, Oomori Y, Tanaka H (1999) Colocalization of gammaaminobutyric acid immunoreactivity and acetylcholinesterase

activity in nerve fibers of the mouse adrenal gland. J Vet Med Sci 61:631–635. https://doi.org/10.1292/jvms.61.631

- Jang I-S, Jeong H-J, Katsurabayashi S, Akaike N (2002) Functional roles of presynaptic GABA A receptors on glycinergic nerve terminals in the rat spinal cord. J Physiol 541:423–434. https://doi.org/ 10.1113/jphysiol.2001.016535
- Kahle KT, Rinehart J, Lifton RP (2010) Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1802:1150–1158. https://doi.org/10. 1016/j.bbadis.2010.07.009
- Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish ME, Iijima T (1997) Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. Jpn J Physiol 47:449–464. https://doi.org/10.2170/jjphysiol.47.449
- Kása P, Dobó E, Wolff JR (1992) GABAergic action on cholinergic axon terminals in the superior cervical ganglion. In: GABA Outs. CNS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 83–93
- Kataoka Y, Gutman Y, Guidotti A, Panula P, Wroblewski J, Cosenza-Murphy D, JY W, Costa E (1984) Intrinsic GABAergic system of adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci 81:3218– 3222. https://doi.org/10.1073/pnas.81.10.3218
- Kataoka Y, Fujimoto M, Alho H, Guidotti A, Geffard M, Kelly GD, Hanbauer I (1986) Intrinsic gamma aminobutyric acid receptors modulate the release of catecholamine from canine adrenal gland in situ. J Pharmacol Exp Ther 239:584–590
- Kato K, Nakagawa C, Murabayashi H, Oomori Y (2014) Expression and distribution of GABA and GABA B-receptor in the rat adrenal gland. J Anat 224:207–215. https://doi.org/10. 1111/joa.12144
- Kidokoro Y, Ritchie AK (1980) Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. J Physiol 307:199–216. https://doi.org/10.1113/jphysiol. 1980.sp013431
- Kowalczyk P, Kulig K (2014) GABA system as a target for new drugs. Curr Med Chem 21:3294–3309. https://doi.org/10.2174/ 0929867321666140601202158
- Lazo-Fernandez Y, Aguilera G, Pham TD, Park AY, Beierwaltes WH, Sutliff RL, Verlander JW, Pacak K, Osunkoya AO, Ellis CL, Kim YH, Shipley GL, Wynne BM, Hoover RS, Sen SK, Plotsky PM, Wall SM (2015) Pendrin localizes to the adrenal medulla and modulates catecholamine release. Am J Physiol Endocrinol Metab 309:E534–E545. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00035.2015
- 42. Matsuoka H, Harada K, Endo Y, Warashina A, Doi Y, Nakamura J, Inoue M (2008) Molecular mechanisms supporting a paracrine role of GABA in rat adrenal medullary cells. J Physiol 586:4825–4842. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.158709
- Oomori Y, Iuchi H, Nakaya K, Tanaka H, Ishikawa K, Satoh Y, Ono K (1993) Gamma-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity in the mouse adrenal gland. Histochemistry 100:203–213. https://doi. org/10.1007/BF00269093
- 44. Oomori Y, Murabayashi H, Kuramoto H, Kawano H, Kato K, Nakagawa C, Sasaki M, Kitamura N, Ishikawa K, Tanaka K (2013) Gamma-aminobutyric acid B receptor immunoreactivity in the mouse adrenal medulla. Anat Rec 296:971–978. https://doi.org/ 10.1002/ar.22697
- Oset-Gasque MJ, Castro E, González MP (1990) Mechanisms of [3H] γ-aminobutyric acid release by chromaffin cells in primary culture. J Neurosci Res 26:181–187. https://doi.org/10.1002/jnr. 490260207
- 46. Peters JA, Lambert JJ, Cottrell GA (1989) An electrophysiological investigation of the characteristics and function of GABAA receptors on bovine adrenomedullary chromaffin cells. Pflugers Arch Eur J Physiol 415:95–103. https://doi.org/10.1007/BF00373146
- 47. Roos A, Boron F (1981) Intracellular pH. Physiol Rev 61:296-434

- Sala F, Nistri A, Criado M (2008) Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. Acta Physiol (Oxf) 192:203–212. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01804.x
- 49. Sarup A, Larsson OM, Schousboe A (2003) GABA transporters and GABA-transaminase as drug targets. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 2:269–277. https://doi.org/10.2174/ 1568007033482788
- Segura-Chama P, López-Bistrain P, Pérez-Armendáriz EM, Jiménez-Pérez N, Millán-Aldaco D, Hernández-Cruz A (2015) Enhanced Ca(2+)-induced Ca(2+) release from intracellular stores contributes to catecholamine hypersecretion in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats. Pflugers Arch 467: 2307–2323. https://doi.org/10.1007/s00424-015-1702-8
- Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA (2004) Tonically active GABA a receptors: modulating gain and maintaining the tone. Trends Neurosci 27:262–269. https://doi.org/10.1016/ j.tins.2004.03.005
- Smith CB, Eiden LE (2012) Is PACAP the major neurotransmitter for stress transduction at the adrenomedullary synapse? J Mol Neurosci 48:403–412. https://doi.org/10.1007/s12031-012-9749-x

- Tanaka C, Taniyama K (1992) The role of GABA in the peripheral nervous system. In: GABA Outs. CNS. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp 3–17
- Valeeva G, Tressard T, Mukhtarov M, Baude A, Khazipov R (2016) An optogenetic approach for investigation of excitatory and inhibitory network GABA actions in mice expressing channelrhodopsin-2 in GABAergic neurons. J Neurosci 36:5961–5973. https://doi. org/10.1523/JNEUROSCI.3482-15.2016
- Vandael DHF, Marcantoni A, Carbone E (2015) Cav1.3 channels as key regulators of neuron-like firings and catecholamine release in chromaffin cells. Curr Mol Pharmacol 8:149–161. https://doi.org/ 10.2174/1874467208666150507105443
- Xie Z, Currie KPM, Cahill AL, Fox AP (2003) Role of Cl- cotransporters in the excitation produced by GABAA receptors in juvenile bovine adrenal chromaffin cells. J Neurophysiol 90: 3828–3837. https://doi.org/10.1152/jn.00617.2003
- Zilberter M (2016) Reality of inhibitory GABA in neonatal brain: time to rewrite the textbooks? J Neurosci 36:10242–10244. https:// doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-16.2016