

# **Rol del receptor purinérgico P2X7 en la liberación de catecolaminas desde la glándula adrenal de ratón.**

Tesis.

Para optar al grado académico de Magister en Ciencias Biológicas, mención Neurociencias.

Alumna:  
Daniela Macarena Ponce López.

Directores de tesis:  
Dra. Ana María Cárdenas Díaz - Dr. Agustín Martínez.

Co-tutora:  
Dra. María Constanza Maldifassi Gatica.

Valparaíso, Diciembre 2021.

## **FINANCIAMIENTO**

El financiamiento de esta tesis fue a través de un proyecto FONDECYT regular N° 1171240.

***A mis sobrinos Mia Pascale  
y Facundo Ignacio.***

# ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>Abreviaciones</b> .....	<b>8</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>11</b>
<b>Identificación del problema</b> .....	<b>20</b>
<b>Pregunta de investigación</b> .....	<b>21</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>22</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>22</b>
<b>Metodología experimental</b> .....	<b>23</b>
Modelo experimental.....	23
Tratamiento de portaobjetos y cubreobjetos con poli-L-lisina al 1%.....	23
Cultivo primario de células cromafines a partir de la glándula adrenal de ratón.....	24
Criosecciones de glándula adrenal murina.....	26
Inmunohistoquímica de glándula adrenal de ratón.....	26
Registros de amperometría en células cromafines en cultivo primario.....	27
Detección de Ca <sup>2+</sup> citosólico en células cargadas con Fluo4-AM.....	33
<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
Identificación inmunohistoquímica de P2X7 en la glándula adrenal de ratón.....	35
Efecto de la degradación de ATP y el antagonismo del receptor P2X7 en la secreción inducida por la activación de los receptores nicotínicos.....	37
Efecto de la degradación de ATP y el antagonismo del receptor P2X7 en la secreción inducida por estímulo depolarizante.....	42

	<b>Pág.</b>
Efecto de la degradación de ATP y el antagonismo del receptor P2X7 en la secreción inducida por un ionóforo de Ca <sup>2+</sup> .....	<b>46</b>
Medición de señales de Ca <sup>2+</sup> citosólico.....	<b>50</b>
Efecto del antagonismo del receptor P2X7 sobre las señales de Ca <sup>2+</sup> citosólico inducida por la activación de los receptores nicotínicos.....	<b>50</b>
Efecto del antagonismo del receptor P2X7 sobre las señales de Ca <sup>2+</sup> citosólico inducida por la despolarización de la membrana.....	<b>51</b>
Efecto del antagonismo del receptor P2X7 sobre las señales de Ca <sup>2+</sup> citosólico inducido por un ionóforo de Ca <sup>2+</sup> .....	<b>52</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>54</b>
Identificación inmunohistoquímica de receptores P2X7 en la glándula adrenal de ratón.....	<b>54</b>
Participación del P2X7 en la liberación de catecolaminas en cultivo primario de células cromafines.....	<b>55</b>
Efecto del antagonismo de P2X7 sobre las señales de Ca <sup>2+</sup> .....	<b>57</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>59</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>61</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1:</b> Representación gráfica del receptor purinérgico del tipo P2X7.....	14
<b>FIGURA 2:</b> Diagrama de la biosíntesis de catecolaminas en células cromafines.....	16
<b>FIGURA 3:</b> Esquema representativo de los 3 mecanismos de exocitosis.....	18
<b>FIGURA 4:</b> Esquema representativo de cultivo primario de células cromafines de ratón.....	25
<b>FIGURA 5:</b> Técnica de amperometría en célula única.....	28
<b>FIGURA 6:</b> Registro de corriente amperométrica representativa.....	30
<b>FIGURA 7:</b> Esquema de una espiga amperométrica individual.....	31
<b>FIGURA 8:</b> Criosecciones de 25 $\mu\text{m}$ del tejido completo de glándula adrenal de ratón.....	36
<b>FIGURA 9:</b> Representación gráfica del número de eventos amperométricos y de Q, estimulando con DMPP 50 $\mu\text{M}$ .....	38
<b>FIGURA 10:</b> Histogramas acumulativos de espigas amperométricas inducidas con DMPP 50 $\mu\text{M}$ .....	39
<b>FIGURA 11:</b> Duración y amplitud de pies amperométricos, estimulando con DMPP 50 $\mu\text{M}$ .....	41
<b>FIGURA 12:</b> Representación gráfica del número de eventos amperométricos y de Q, estimulando con KCl 70 mM.....	42
<b>FIGURA 13:</b> Histogramas acumulativos de espigas amperométricas inducidas con KCl 70 mM.....	43
<b>FIGURA 14:</b> Duración y amplitud de pies amperométricos estimulando con KCl 70 mM.....	45
<b>FIGURA 15:</b> Representación gráfica del número de eventos amperométricos y de Q, estimulando con ionomicina 10 $\mu\text{M}$ .....	46

	<b>Pág.</b>
<b>FIGURA 16:</b> Histogramas acumulativos de espigas amperométricas inducidas con Ionomicina 10 $\mu\text{M}$ .....	<b>47</b>
<b>FIGURA 17:</b> Duración y amplitud de los pies amperométricos estimulando con Ionomicina 10 $\mu\text{M}$ .....	<b>49</b>
<b>FIGURA 18:</b> Mediciones de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en células cargadas con Fluo4-AM, estimulando con DMPP 50 $\mu\text{M}$ .....	<b>50</b>
<b>FIGURA 19:</b> Mediciones de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en células cargadas con Fluo4-AM, estimulando con KCl 70 mM.....	<b>51</b>
<b>FIGURA 20:</b> Mediciones de $\text{Ca}^{2+}$ citosólico en células cargadas con Fluo4-AM, estimulando con Ionomicina 10 $\mu\text{M}$ .....	<b>52</b>

## ABREVIACIONES

<b>ATP</b>	: Trisfosfato de adenosina.
<b>Apy</b>	: Apirasa.
<b>ADP</b>	: Adenosina difosfato.
<b>cAMP</b>	: Adenosin monofosfato cíclico.
<b>RsPs</b>	: Receptores purinérgicos. .
<b>P2X7</b>	: Receptor purinérgico del tipo P2X7.
<b>HPA</b>	: Eje Hipotalámico pituitario adrenal.
<b>nAChR</b>	: Receptores nicotínicos del tipo neuronal.
<b>ACh</b>	: Acetilcolina.
<b>L-DOPA</b>	: Levodopa.
<b>TH</b>	: Tirosina hidroxilasa.
<b>L-AADC</b>	: Descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos.
<b>DBH</b>	: Dopamina $\beta$ -hidroxilasa.
<b>PNMT</b>	: Feniletanolamina N-metiltransferasa.
<b>SNARE</b>	: Del inglés, <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor</i> .
<b>WT</b>	: Del inglés "Wild type"
<b>LGB</b>	: Buffer Locke/Glucosa/BSA.
<b>FBS</b>	: Del inglés " <i>Fetal Bovine Serum</i> ".
<b>A/A</b>	: Antibiótico/Antifúngico.
<b>PBS</b>	: Tampón fosfato salino.

**RT** : Temperatura ambiente.

**DAKO** : Medio de montaje acuoso para fluorescencia.

**DMPP 50** : Yoduro de 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio.

**KCl** : KCl 70 mM.

**Iono** : Ionomicina 10  $\mu$ M.

**A74** : A74003 10  $\mu$ M.

**HBSS** : Solución equilibrada de Hank

**TIRFm** : del inglés "*Total internal reflection fluorescence microscope*"

## RESUMEN

El trifosfato de adenosina (ATP) es la principal molécula que entrega energía a la célula y desempeña un papel central en la señalización celular, actuando como ligando de receptores purinérgicos. El ATP se acumula en vesículas secretoras y se libera al espacio extracelular, mediante la exocitosis. Los receptores purinérgicos que responden a nucleótidos se clasifican en P1, P2Y y P2X. El receptor de nuestro interés, P2X7, se activa a concentraciones altas de ATP y se encuentra en varios tipos celulares, incluyendo células cromafines. Estas sintetizan catecolaminas y regulan principalmente la respuesta al estrés. En este trabajo se propone investigar si los receptores P2X7 están presentes en la médula de la glándula adrenal de ratón y si estos contribuyen a la liberación de catecolaminas y a la autorregulación de esta. Se propone: (1) identificar este receptor mediante inmunohistoquímica de la médula adrenal de ratón en tejido completo, (2) determinar el efecto del antagonista selectivo de los P2X7, A74003 (A74), sobre los eventos de exocitosis y (3) las señales de  $Ca^{2+}$  citosólico. Además, se evaluarán distintos secretagogos en presencia de este antagonista y de una enzima que hidroliza ATP, Apirasa (Apy). Nuestros resultados indican que el receptor P2X7 se encuentra presente en el citoplasma de las células cromafines de ratón. Al evaluar la liberación de catecolaminas (amperometría) se pudo observar que en presencia de A74 y Apy hubo una disminución del número de eventos de exocitosis, disminuyendo también el área bajo la espiga (Q), los histogramas acumulativos de espigas y la duración del pie. Los resultados obtenidos indican que P2X7 estaría regulando la formación del poro de fusión, además de autorregular positivamente la exocitosis.

## INTRODUCCIÓN

El ATP es la principal molécula que entrega energía a nivel celular, y que además puede ser liberado en condiciones tanto fisiológicas como patológicas (Bjelobaba et al, 2015). Su estructura química consiste en una base nitrogenada, una ribosa y 3 grupos fosfato unidos en serie. Su importancia biológica va mucho más allá de su rol clásico como metabolito energético. Además de proporcionar energía, a través de su hidrólisis (liberación de un grupo fosfato), quedando como adenosín difosfato (ADP). El ATP desempeña un papel central en la señalización celular a corto plazo en la neurotransmisión, neuromodulación y neurosecreción, así como también tiene funciones a largo plazo en la proliferación, diferenciación y muerte celular (Burnstock, 2011). También cumple funciones como sustrato para la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP), un segundo mensajero crítico en la transducción de señal o como ligando de receptores purinérgicos (RsPs), tanto ionotrópicos como metabotrópicos (Rajendran et al, 2016; Dunn, et al, 2021).

En el caso de células neuronales y/o neuroendocrinas, el ATP se acumula en vesículas o gránulos secretores y se libera al espacio extracelular mediante exocitosis junto a otros componentes como neurotransmisores u hormonas (Chern et al, 1987 y 1988; Afework y Burnstock, 1999; Burnstock, 2011; Borges et al, 2013).

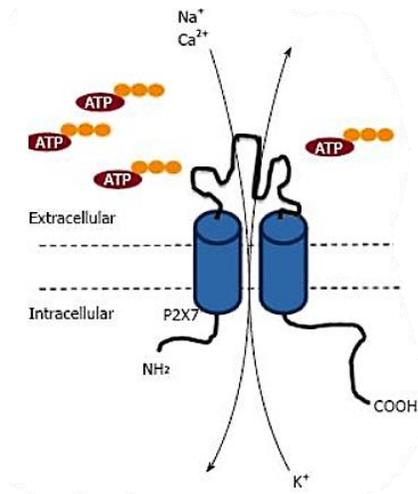
Los RsPs son un grupo de proteínas que se encuentran mayoritariamente en la membrana plasmática en casi todos los tejidos de mamíferos. Sin embargo, la expresión de los distintos tipos subtipos de RsPs varía de un tejido a otro y entre distintas especies, además responden con distinta sensibilidad a ATP y a otros nucleótidos y su activación prolongada puede inducir la formación de poros no selectivos, que fácilmente pueden permear moléculas de gran tamaño (North, 2002; Tomé et al, 2007; Waxham, 2014; Craigie et al, 2013; Gicquel et al, 2017). La gran familia de RsPs en mamíferos se clasifica según criterios farmacológicos en: (a) P1R, que son receptores metabotrópicos activados por adenosina y a su vez estos se clasifican en 4 subtipos: A1 y A3 (acoplados a proteína  $G_i$ ) y A2a y A2b (acoplados a proteína  $G_s$ ) y (b) P2R, que se activan con ATP o ADP (Abbracchio et al, 1994). Los receptores P2, se subclasifican en receptores metabotrópicos, los del tipo P2Y, que se divide en 8 subtipos (P2YR1; 2; 4; 6; 11; 12; 13 y 14) (Boeynaems et al, 2005; Burnstock, 2011; Gicquel et al, 2017) y en receptores del tipo ionotrópicos, P2XR, que se activan exclusivamente por ATP (Cattaneo, 2006), y controlan la entrada de  $Na^+$  y/o  $Ca^{2+}$ , y la salida de  $K^+$  (Burnstock y Kennedy, 2011; Park y Kim, 2017). A la fecha, se han descubierto 7 subtipos de P2X (P2X1; 2; 3; 4; 5; 6 y 7) (Donnelly-Roberts et al, 2009; Gicquel et al, 2017).

En células endocrinas, la señalización purinérgica tiene gran importancia biológica (Burnstock, 2014; Bjelobaba et al, 2015). Un ejemplo de ello es en la hipófisis posterior bovina donde se observó una actividad de la adenosina trifosfatasa, una enzima que degrada ATP (Vilhardt y Hope, 2014), sugiriéndose por primera vez una señalización purinérgica en células del tipo neuroendocrinas (Burnstock, 2014). Con

anterioridad, se demostró que ATP inducía la liberación de vasopresina (Overgaard et al, 1979, Mori et al, 1994; Burnstock, 2014). Otros estudios sobre ATP y RsPs señalaron que la liberación de ATP y la presencia de distintos subtipos del receptor P2X, incluyendo el receptor P2X7 parecen estar asociados entre sí, regulando procesos fisiológicos (Li et al, 2011; Burnstock, 2014).

El receptor P2X7 (Figura 1) es activado por altas concentraciones, en un rango aproximado entre 50  $\mu$ M y 2.5 mM, de ATP ( $EC_{50} \geq 1$  mM) (Karasawa y Kawate, 2016; Sluyter, 2017) y se encuentra formado por 3 subunidades que en su mayoría forman homotrómeros, aunque también pueden formar receptores heterotrómeros con otros tipos de RsPs (Boumechache et al, 2009; Craigie et al, 2013). Este receptor se caracteriza por tener un dominio C-terminal muy largo y se sabe en la actualidad que este dominio regula su localización en los distintos tipos de células, además de la señalización celular (Costa-Junior, et al, 2011; Park y Kim, 2017). P2X7 se encuentra en diversos tipos celulares, incluyendo células gliales, neuronas, células exocrinas y neuroendocrinas, como las células cromafines de la glándula adrenal. (Sluyter, 2017). Diversos estudios señalan que P2X7 sería potencialmente importante en células neuroendocrinas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Un ejemplo de ello es la investigación del grupo liderado por Tozzi et al (2018) demostrando que la activación de los receptores P2X7 en las células  $\beta$  del páncreas de rata potenciaron la secreción de insulina tanto en condiciones no estimulantes (2.8 mM de glucosa basal) como a altas concentraciones (25 mM) de glucosa. Se conoce también que varias enfermedades han sido relacionadas con RsPs. Específicamente se ha observado que la sobreexpresión de P2X7 se

encuentra directamente asociado con el dolor neuropático y en la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras enfermedades del tipo inflamatorias (Yiangou et al, 2006; Arulkumaran et al, 2011; Arribas-Blázquez et al, 2019).



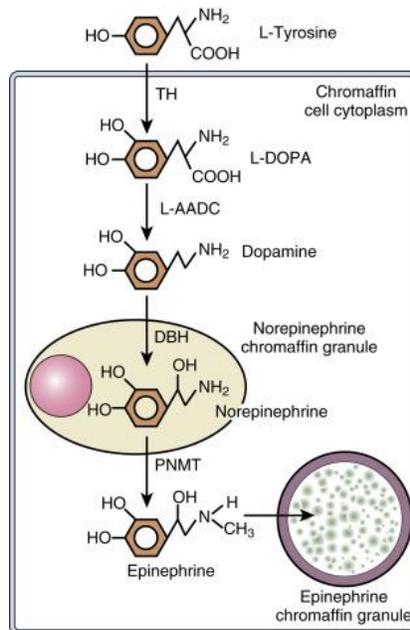
**FIGURA 1:** Representación gráfica del receptor purinérgico del tipo P2X7 (P2X7). Se observa el P2X7 que al ser activado por una molécula de ATP extracelular provoca una entrada de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  y una salida de  $K^+$  (Geraghty et al, 2017).

Las glándulas adrenales, también conocidas como glándulas suprarrenales son estructuras que se ubican anatómicamente (en mamíferos) en la parte superior de los riñones y pertenecen al eje neuroendocrino hipotálamo – pituitaria – adrenal (HPA) y su principal función es regular la respuesta a estresores predecibles y estacionales, como la época de reproducción en animales silvestres, así como también estresores impredecibles, lucha y escape de alguna situación de peligro (Kempná y Flück, 2008; Di Lorenzo et al, 2020).

Para desempeñar estas funciones, esta glándula se divide en dos órganos endocrinos completamente diferentes, pero estrechamente relacionados. Por una parte, tenemos la corteza adrenal, la cual es de origen mesodérmico y tiene células distribuidas en 3 capas (desde el exterior hacia el interior): zona glomerular, fasciculada, y reticular, las que sintetizan mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos a partir del colesterol, respectivamente (Miller, 1988; Kempná y Flück, 2008). En cambio, la médula adrenal en donde se encuentran las células cromafines es de origen ectodérmico (cresta neural, mismo origen de células neuronales). Estas células se encuentran distribuidas en pequeños cúmulos y se encuentran altamente inervadas por terminaciones nerviosas y tejido conectivo. Las células cromafines sintetizan diversos neuropéptidos (Cocchia y Michetti, 1981 Berger, et al 2019, Di Lorenzo et al, 2020), como también noradrenalina y adrenalina, siendo esta última la principal fuente de adrenalina en el organismo (Wong, 2003; Albillos y McIntosh, 2018).

La glándula suprarrenal completa se encuentra inervada por las terminaciones axónicas del nervio esplácnico que libera acetilcolina (ACh). Cuando se estimula el nervio esplácnico mediante algún estresor, se libera ACh activando los receptores nicotínicos (nAChR) de las células cromafines presentes en el interior de la glándula adrenal (médula adrenal) (Criado, 2017). La activación de estos receptores despolariza la membrana plasmática de las cromafines, llevando a la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, con el consecuente aumento transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y, culmina con la liberación de las moléculas almacenadas en los gránulos cromafines (Weiss, 2012).

La síntesis de catecolaminas ocurre específicamente en el citoplasma de las células cromafines y se inicia con la conversión de L-tirosina a levodopa (L-DOPA), gracias a la tirosina hidroxilasa (TH). Luego L-DOPA se transforma en dopamina gracias a la descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (L-AADC) (Figura 2). Ya en el interior de los gránulos cromafines, la dopamina se convierte en noradrenalina gracias a la dopamina β-hidroxilasa (DBH) y finalmente en adrenalina por medio de feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) (Pacak et al, 2016), quedando almacenadas en las vesículas para su próxima liberación.



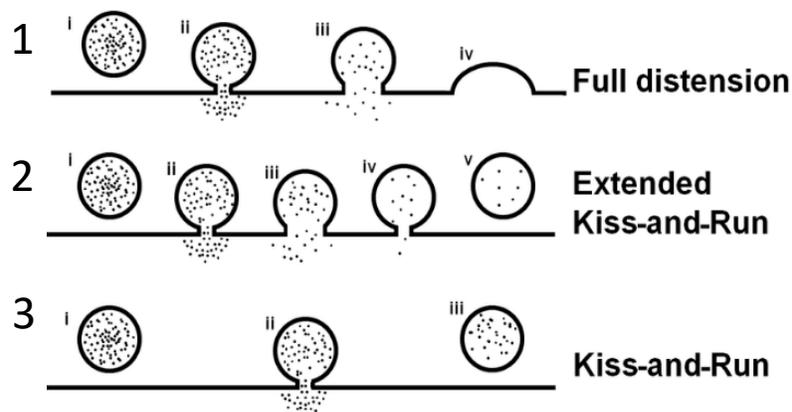
**FIGURA 2:** Diagrama de la biosíntesis de catecolaminas en células cromafines. TH: tirosina hidroxilasa; L-AADC: descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos; DBH: dopamina β-hidroxilasa; PNMT: feniletanolamina N-metiltransferasa (Pacak et al, 2016).

Los gránulos cromafines además de almacenar adrenalina y la noradrenalina también contienen ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , cromogranina, aminas y opioides, entre otros péptidos. Estas vesículas son electrodensas y rápidamente son transportadas hacia la superficie para que su contenido sea liberado, mediante el proceso de exocitosis, mediado previamente por una despolarización de la membrana plasmática (por ejemplo, una activación de los receptores nicotínicos o altas concentraciones de  $\text{K}^+$  en el medio extracelular), que lleva a un aumento transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, por ende, una despolarización de la membrana (Villanueva et al, 2012). Estos gránulos se originan en el retículo endoplásmico, tienen un diámetro entre 100 a 300 nm y cada vesícula tiene concentraciones aproximadas de 200 mM de ATP, 40 mM  $\text{Ca}^{2+}$  y 800 mM de catecolaminas (Brandan et al 2010; Lee y Hook, 2009).

La fusión de los gránulos cromafines con la membrana plasmática permite la descarga del contenido de estos hacia el torrente sanguíneo. Este proceso ocurre mediante exocitosis dependiente de las proteínas SNARE (del inglés *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor*) (Marengo y Cárdenas, 2018). Las proteínas SNARE comprenden la proteína v-SNARE que se encuentra en la membrana de la vesícula y se asocia con las t-SNAREs que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática (Fathali y Cans, 2018).

Existen distintos tipos de exocitosis: (1) la exocitosis completa, donde la vesícula se fusiona completamente con la membrana plasmática de la célula, liberando todo su contenido al medio extracelular, (2) la exocitosis en donde el poro de fusión se abre por un tiempo determinado liberando el contenido vesicular y luego se cierra,

pudiendo quedar o no contenido dentro de la vesícula (llamado del inglés “*Extended Kiss and run*”) y (3) el último tipo de exocitosis conocido, la vesícula no libera todo su contenido, mantiene su forma y es reciclada (Figura 3). Este tipo de exocitosis es llamado “besar y correr” o del inglés “*Kiss and run*” en donde un poro de fusión se abre 1–2 nm y permite una mínima liberación del contenido vesicular (Álvarez de Toledo et al, 1993; Stevens et al, 2011 y Fathali y Cans, 2018). La existencia de diferentes tipos de exocitosis, permitirían en células cromafines una liberación diferencial de catecolaminas, que podrían ejercer diversas funciones en el organismo.



**FIGURA 3:** Esquema representativo de los 3 mecanismos de exocitosis. **(1)** Distensión completa de la vesícula en la membrana, **(2)** formación del poro de fusión, ocurriendo la liberación de vesículas y **(3)** en donde ocurre la formación y apertura del poro de fusión, pero su fusión es transitoria, para luego desacoplarse de la membrana y reciclarse dentro de la célula (Mellander et al, 2012).

La exocitosis en células cromafines es regulada principalmente por las terminaciones nerviosas del nervio esplácnico, además de la regulación por moléculas circundantes en el torrente sanguíneo. Existe también una autorregulación en la liberación de catecolaminas al medio extracelular, tanto positiva como negativa, mediante la presencia de autorreceptores. Se han identificado autorreceptores adrenérgicos del tipo  $\alpha_2$  que son activados por adrenalina y noradrenalina, catecolaminas que son liberadas desde la misma célula o desde células vecinas, desencadenando una regulación negativa en la liberación de catecolaminas, es decir, disminuye la exocitosis de gránulos hacia el medio extracelular (Artalejo y Olivos-Oré, 2018). En cambio, los receptores del tipo  $\beta_2$  adrenérgicos se activan cuando hay bajas concentraciones de catecolaminas, activando un mecanismo de regulación positiva, mediado por adenilato ciclasa (Harkins y Fox, 2000; Brandan, et al, 2010).

También existen otros moduladores autocrinos en células cromafines, como el ATP, que actuarían a través de RsPs acoplados a proteína G a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Se ha descrito que algunos receptores purinérgicos del tipo P2Y<sub>12</sub> inhiben negativamente la exocitosis en células cromafines de bovino mediante la participación de un receptor de pirimidina acoplado a proteína  $G_i/G_o$ , lo que hasta la fecha se define como un componente clave en la retroalimentación negativa de la exocitosis en células neuroendocrinas (Tomé et al, 2014; Ennion, et al, 2004).

## IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El papel de los receptores P2X7 en la regulación de la liberación de catecolaminas es desconocido, a pesar de haber sido identificados en la médula de la glándula adrenal de rata (Afework y Burnstock, 1999) y más recientemente se supo que P2X7 aumenta su expresión en la glándula adrenal, en un modelo de dolor neuropático (Arribas-Blázquez, et al, 2019) y en otras enfermedades del tipo inflamatorias (Liu y Liu, 2019). Hasta la fecha se sabe que un subtipo de receptor purinérgico (del tipo P2Y) presente en las células cromafines de bovino regula de manera negativa la exocitosis (Hernández-Guijo et al, 1999; Ennion et al 2004; Tomé et al, 2000; Powell et al, 2000), pero se desconoce si existe una autorregulación positiva asociado a RsPs, específicamente del P2X7. Por lo tanto, es necesario identificar la presencia de este receptor en la médula de la glándula adrenal de ratón e investigar qué rol cumple el receptor P2X7 en la liberación de catecolaminas inducida por la activación de receptores nicotínicos (tal como sucede de manera fisiológica), por una despolarización de la membrana plasmática y por un aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Contribuyen los receptores purinérgicos del tipo P2X7 a la liberación de catecolaminas desde células cromafines de la glándula adrenal de ratón de cultivo primario?

## **HIPOTESIS**

Los receptores P2X7 contribuyen de manera positiva a la secreción de catecolaminas inducida por diversos secretagogos en células cromafines de la glándula adrenal de ratón, y esta acción estaría mediada por un aumento en las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar en células cromafines de ratón la contribución del receptor P2X7 a las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y a los eventos de exocitosis inducidas por activación del receptor nicotínico, despolarización de la membrana por altas concentraciones de  $\text{K}^+$ , o por un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✘ Identificar la presencia del receptor P2X7 en la médula de la glándula adrenal de ratón completa, mediante criosecciones e inmunohistoquímica.
- ✘ Evaluar los efectos de la degradación de ATP (apirasa) y del antagonista específico de los receptores P2X7, A74003 sobre el número de eventos de exocitosis inducidas por diversos secretagogos, en células cromafines de ratón en cultivo primario.
- ✘ Determinar el efecto del antagonista específico del receptor P2X7 sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducidas por diversos secretagogos desde células cromafines de ratón en cultivo.

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Modelo experimental:** Este trabajo de investigación se realizó con glándulas adrenales de ratón WT (del inglés *Wild type*) C57BL/6. Los animales fueron obtenidos bajo previa aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, Chile (código de aprobación CBC11/2021. Ver Anexo 1).

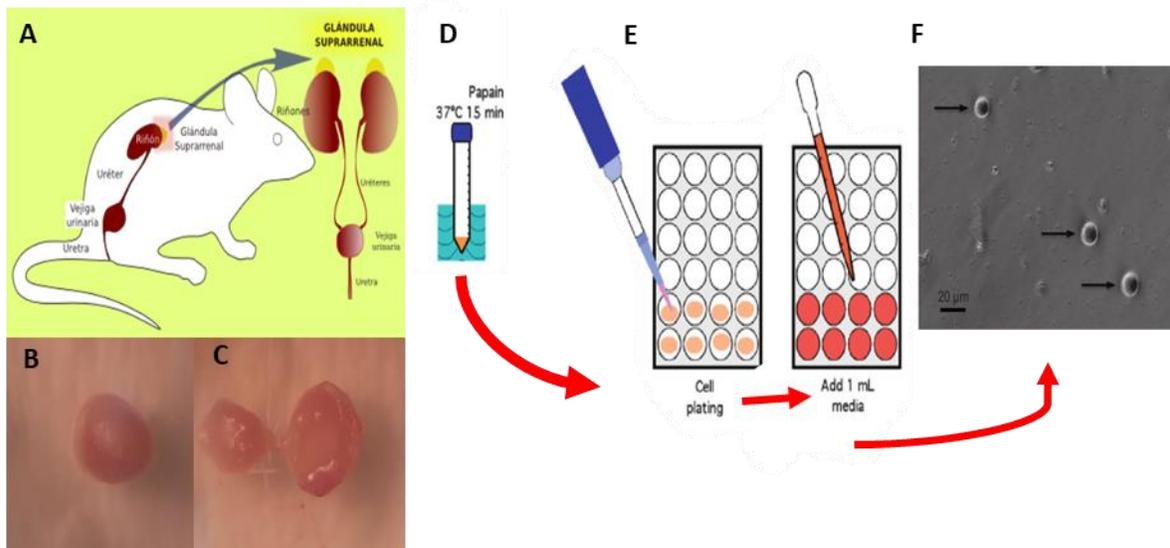
**Tratamiento de portaobjetos y cubreobjetos con poli-L-lisina:** Para el tratamiento de los portaobjetos, estos se limpiaron previamente con alcohol 70% con el fin de eliminar suciedad y/o grasa que puedan contener los vidrios. Finalmente, se vertieron 20  $\mu$ L de poli-L-lisina (directo del stock) que fue extendida a través de toda la superficie. Se dejó secar por 1 hora para repetir nuevamente el proceso. Los cubre objetos ya tratados fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

Los cubre objetos fueron tratados con poli-L-lisina 1% (100  $\mu$ L por cubreobjeto), fueron colocados en placas multipocillos de 6 e incubados por 1 hora a 37 °C. Pasado el tiempo, se lavó el pocillo con agua autoclavada y se dejaron secar las placas por al menos 24 horas en el incubador.

### **Cultivo primario de células cromafines a partir de la glándula adrenal de ratón:**

El cultivo primario de estas células se realizó extirpando las glándulas adrenales del animal previamente eutanasiado bajo las estrictas normas de bioética. Las glándulas se dejan en tampón estéril Locke/Glucosa/BSA (LGB). Bajo lupa, se procedió a realizar una pequeña incisión para extraer con mucho cuidado la médula adrenal. Cabe destacar que todo este procedimiento se realizó en campana de cultivo apta para cultivos primarios, para evitar contaminación cruzada. Extraída la médula se dejó incubando a 37 °C en 50 µL de papaína (0.4 mg/mL) por 15 minutos, para poder disgregar las células del tejido. Pasado los minutos se lavó cuidadosamente el tejido con el tampón LGB y se agregaron 600 µL de medio de cultivo DMEM–F12, 10% suero bovino fetal (FBS), 1% antibiótico/antifúngico (A/A), para sembrar de 6 a 8 pocillos que en su interior tienen un cubreobjetos de 24 mm, previamente tratados con poli-L-lisina 1%. Se disgregó vigorosamente el tejido con una micropipeta, para finalmente sembrar 50 - 100 µL de este contenido en la placa multipocillo. Se esperaron 30 minutos, para que las células decanten y se adhieran. Finalmente, se rellenan los pocillos 1 mL o hasta que queden completamente cubiertos de medio de cultivo DMEM-F12. Los experimentos se llevaron a cabo 48 horas después de realizado el cultivo primario.

A continuación, en la Figura 4 se muestra un esquema representativo de cómo se realizó el cultivo primario de células cromafines en este trabajo.



**FIGURA 4:** Esquema representativo de cultivo primario de células cromafines de ratón. **A.** Ilustración de donde se ubican anatómicamente las glándulas adrenales en el animal. **B.** Glándula adrenal extraída completa y limpia de tejidos anexos. **C.** La glándula se debe diseccionar por la mitad para exponer la médula de la glándula adrenal, que es en donde se encuentran las células cromafines. Con mucho cuidado, se procede a extraer la médula adrenal con material quirúrgico adecuado. **D.** La médula se deja en un tubo junto a papaína (0.4 mg/mL) a 37 °C por 15 minutos. **E.** Lavado previamente el tejido con LGB para quitar la papaína, se agregan 600 µL de medio DMEM–F12, se disgrega el tejido y se siembran los pocillos. Se esperan 30 minutos para que las células decanten y se adhieran al cubreobjeto pretratado con poli–L–lisina 1%. Se agregan aproximadamente 1 mL de medio o hasta cubrir generosamente el cubreobjetos. **F.** Ejemplo representativo de 3 células cromafines viables pasado 24 horas posterior al cultivo primario de células cromafines. Imagen D y E obtenidas de Domínguez et al, 2012. Imagen F

obtenido de Varga et al, 2014.

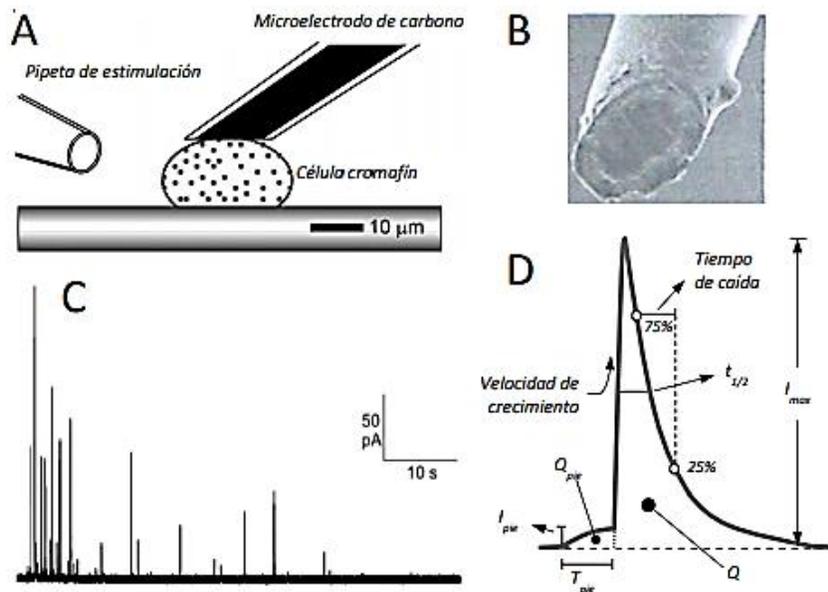
**Criosecciones de glándula adrenal murina:** La glándula extraída fue limpiada de tejidos anexos (principalmente grasa) y fijada en PFA 4% por 12 horas. Posterior a ello, se lavó generosamente, al menos tres veces, con tampón fosfato salino al 1% (PBS) por 5 minutos. A continuación, el tejido se sometió a un gradiente de sacarosa en PBS, que cumplió la función de crioproteger el tejido de las bajas temperaturas al cual será expuesto. Este gradiente se efectuó de manera creciente, es decir, sacarosa 10%; 20% y finalmente 30%, cada solución de sacarosa se dejó toda la noche. Para realizar los cortes histológicos, la muestra se montó en un medio de montaje apto para bajas temperaturas, Tissue-Tek® O.C.T™ (*Optimal Cutting Temperature*). Este líquido de montaje preserva las estructuras del tejido frente a la congelación, protegiéndolo también de la deshidratación y los cambios de temperatura. Se realizaron criosecciones de 25  $\mu\text{m}$  a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esos cortes fueron adheridos a un portaobjeto previamente tratado con poli-L-lisina, que evitó el desprendimiento del tejido al realizar la inmunohistoquímica.

**Inmunohistoquímica de glándula adrenal de ratón:** Las criosecciones obtenidas se lavaron 2 veces por 10 minutos con PBS con el fin de quitar el exceso de medio de montaje. Luego, las membranas celulares del tejido se permeabilizaron con una solución Triton X-100 0.5% en PBS por 30 minutos, se lavaron 3 veces con PBS para dejarlas durante 1 hora en solución bloqueo que contiene BSA 3% en PBS, lo cual evita que el anticuerpo se una a sitios inespecíficos. Finalmente, el tejido se

incubó con un anticuerpo policlonal anti-P2X7 (antirabbit Abcam, 1:500, en solución bloqueo) por toda la noche a 4°C. Al término de la incubación, la muestra se lavó con PBS para quitar excesos del anticuerpo primario y se incubó con un anticuerpo secundario (anti-conejo IgG H&L Cy3®, 1:1000 en PBS) por 3 horas a temperatura ambiente (RT), protegiéndolo de la luz. Posteriormente, se realizaron 3 lavados antes de incubar por 15 minutos a RT con DAPI (1:1000, en PBS), un marcador fluorescente que se une al ADN. El procedimiento se terminó con 3 lavados abundantes de 10 minutos cada uno, para retirar restos de DAPI. Las muestras fueron montadas en medio de montaje acuoso para fluorescencia (DAKO), el cual retarda el desvanecimiento de la fluorescencia. Montadas las muestras, fueron observadas en un microscopio confocal (Nikon C1 Plus, láser 408 nm y 543 nm).

**Registros de amperometría en células cromafines en cultivo primario:** Esta técnica nos permitió cuantificar la liberación de neurotransmisor desde una vesícula individual. La amperometría, la cual es ampliamente conocida por su sencillez y su excelente resolución temporal, nos proporciona información de cuánto neurotransmisor se libera desde una vesícula cromafín (Fathali y Cans, 2018). Este método electroquímico consiste en posicionar cerca de la célula cromafín un microelectrodo que contiene en su interior una fibra de carbono y un alambre de plata en una solución de KCl 3 M, el cual actúa como un electrodo de referencia, aplicando un potencial de oxidación específico al electrodo, en este caso se aplicó el potencial de oxidación para catecolaminas, 680 mV, que sólo permite oxidar adrenalina y noradrenalina y, no otros compuestos liberados desde los gránulos cromafines. Al oxidarse las moléculas electroactivas se liberan electrones, los

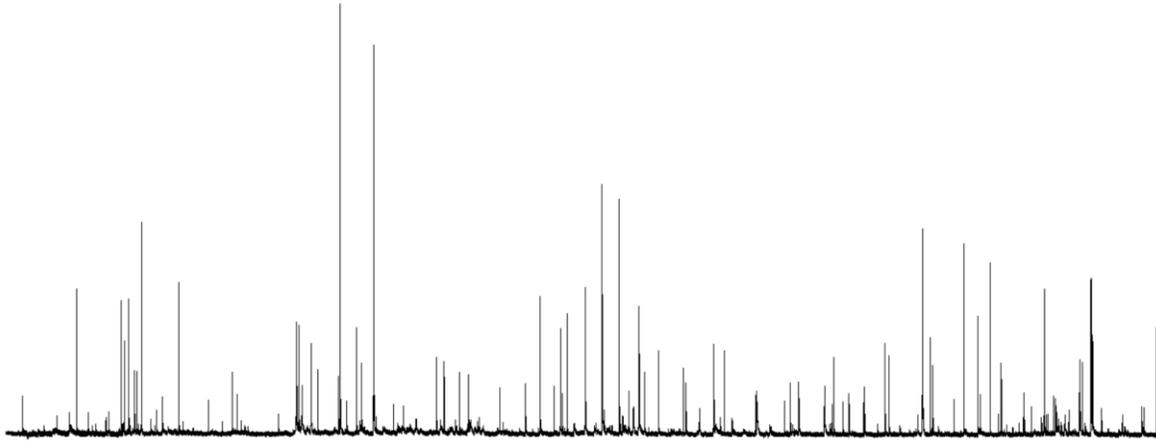
cuales son detectados por el electrodo de carbono y pueden ser observados, después de su amplificación, como espigas individuales de corriente (Figura 5) (Fathali y Cans, 2018; Ardiles et al, 2006). Gracias a estas condiciones podremos observar si al inducir la exocitosis con distintos secretagogos en presencia o ausencia de inhibidores, se ve afectado el proceso de exocitosis.



**FIGURA 5:** Técnica de amperometría en célula única. **A.** Esquema de la técnica de amperometría con una célula cromafín siendo estimulada con el microelectrodo de carbono y estimulada con la pipeta de estimulación. **B.** Extremo de una fibra amperométrica observada en un microscopio electrónico. **C.** Esquema de una respuesta típica de una célula cromafín tras un estímulo secretor. **D.** Representación de una espiga amperométrica, exhibiendo sus parámetros.  $Q$  es el área de la espiga o liberación cuantal por evento;  $t_{1/2}$  representa el ancho de la espiga al 50% de su altura;  $I_{max}$  es la altura de la espiga;  $I_{pie}$  es la amplitud del pie de la espiga;  $T_{pie}$  es el tiempo de duración de este pie y  $Q_{pie}$  es la liberación cuantal de catecolaminas

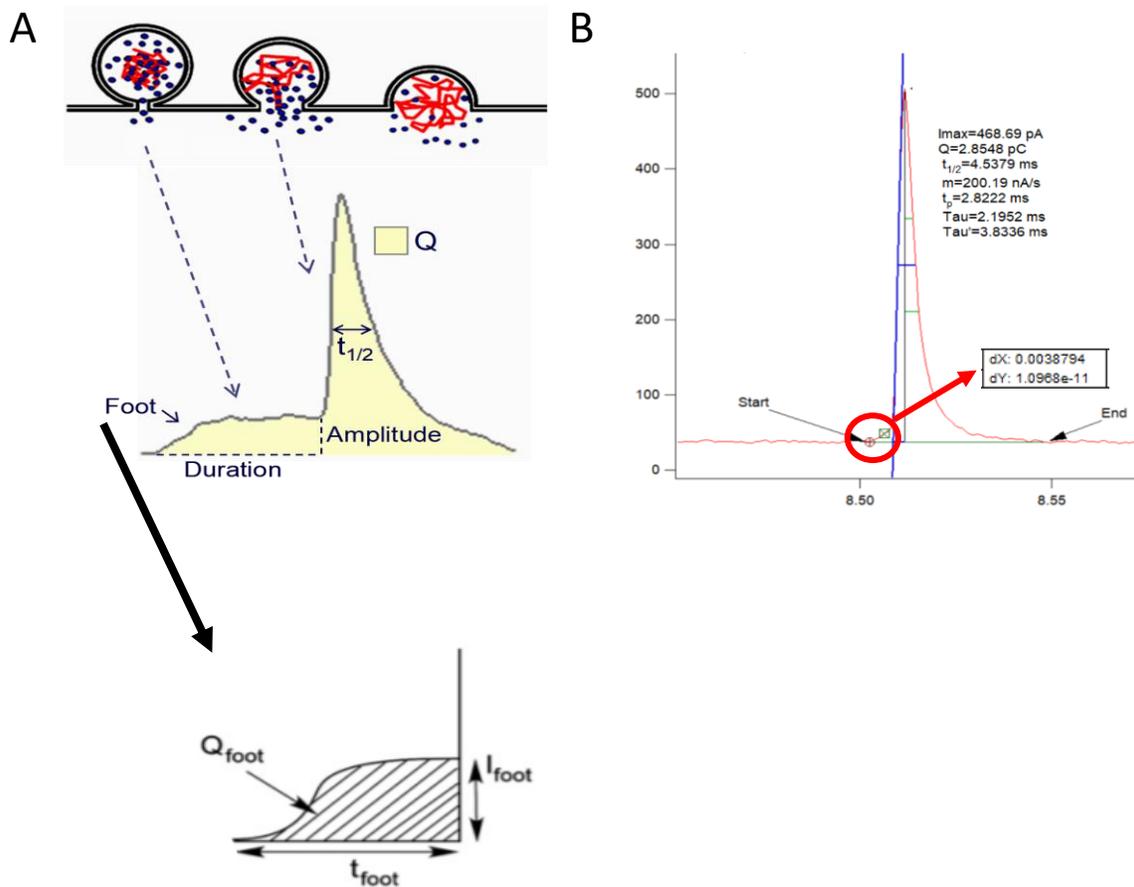
durante el pie. Calvo Enrique (2015).

Las células fueron cultivadas en cubreobjetos de 12 mm previamente tratados con poli-L-lisina 1%. La estimulación se realizó a través de un pulso de 10 segundos de aire comprimido, con un picospritzer, que se le aplicó a una micropipeta que contiene el secretagogo, en este caso un agonista de los receptores nicotínicos, Yoduro de 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio (DMPP) en una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , KCl en una alta concentración (70 mM) que inducen despolarización de la membrana, o el ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ionomicina (Iono) a 10  $\mu\text{M}$  que permea  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula. Todos ellos fueron aplicados en ausencia o presencia del antagonista del receptor P2X7, A74003 (A74), en una concentración de 10  $\mu\text{M}$  o de una enzima que hidroliza ATP, apirasa (Apy) en una concentración de 2U/mL. El registro amperométrico tiene una duración de 100 segundos (Figura 6). Los resultados fueron analizados en el programa IGOR (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA).



**FIGURA 6:** Registro de corriente amperométrica representativa. Corresponde a un registro de 100 segundos de una célula cromafín de ratón estimulada con una solución de KCl 70 mM.

Para analizar los registros de amperometría, se analizó cada espiga, las cuales debían cumplir con los siguientes criterios: Debe tener una amplitud mayor a 10 pA y una duración mayor a 3 ms en la mitad de su altura. También se analizó la corriente que precede a la espiga, llamada pie. En este caso se consideraron los pies, con una amplitud igual o mayor a 3 pA y una duración de 3 ms (Figura 7).



**FIGURA 7:** Esquema de una espiga amperométrica individual. **A.** En la parte superior podemos observar lo que está sucediendo al fusionarse una vesícula con la membrana celular. Podemos notar en primera instancia la formación del pie, que nos indica la estabilidad del poro de fusión; la amplitud del pie refleja el flujo de catecolaminas a través del poro;  $Q$ , que es el área bajo la curva de la espiga, que nos indicaría la cantidad de catecolaminas liberado por evento (coloreado de amarillo) y  $t_{1/2}$  que es el ancho medio de la espiga, reflejando la duración del evento. Le flecha nos indica los mismos parámetros mencionados con anterioridad, pero en el pie de la espiga. **B.** Gráfica de una espiga individual que representa un evento de exocitosis de una vesícula individual estimulada con KCl 70 mM. En el costado

superior derecho se encuentran los parámetros  $I_{max}$  estaría siendo la amplitud total de la espiga (468.69 pA) y  $t_{1/2}$  que estaría reflejando la duración del evento (4.5379 ms). Lo que se encuentra encerrado en el círculo rojo es el pie de la espiga. Se sobreponen cursores para poder medir los parámetros a esta espiga.  $dX$  (0.0038794 ms) es la duración del pie en ms y  $dY$  ( $1.0968 \times 10^{-11}$  pA) estaría siendo la amplitud del pie (Amatore et al, 2007).

Para realizar el análisis de histogramas acumulativos de espigas amperométricas se cuantificaron las espigas que había en un periodo de tiempo determinado. Terminado el conteo de espigas, se aplicó la sumatoria de estas.

La estadística de estos registros se realizó utilizando el programa GraphPad Prisma 5, comparando los distintos agonistas utilizados en este estudio (DMPP 50  $\mu$ M, KCl 70 mM y Iono 10  $\mu$ M) con sus respectivas condiciones (en ausencia o presencia de A74 o Apy). Para el número de eventos, Q y duración de los pies se utilizó la prueba t de student, considerando una prueba no paramétrica, asumiendo que los datos no cumplen con una distribución Gaussiana (Prueba Mann-Whitney), con un intervalo de confianza del 95%. Para la gráfica de los histogramas acumulativos de espigas amperométricas se utilizó ANOVA de doble vía (Variable tiempo y cantidad de espigas) con una prueba posterior de Bonferroni, comparando cada columna del agonista utilizado (en este caso comparamos DMPP 50  $\mu$ M, KCl 70 mM o Iono 10  $\mu$ M, con las demás condiciones expuestas en este trabajo, ausencia o presencia de A74 o Apy).

**Detección de Ca<sup>2+</sup> citosólico en células cargadas con Fluo4-AM:** Este compuesto se utiliza principalmente para medir los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Fluo4-AM fue incubado por alrededor de 5 minutos (concentración final 3.5 µM) junto a 1% de ácido plurónico “Pluronic® F-127 (cat # 59004)”, en 600 µL de solución salina equilibrada de Hank (HBSS), lo cual ayuda a permeabilizar con mayor facilidad. Pasado los 5 minutos se agrega la solución a los cubreobjetos con las células cromafines y se deja incubando entre 40–45 minutos. Estando dentro de la célula, el Fluo-4AM se hidroliza a Fluo-4 libre, gracias a esterasas endógenas. Esta molécula se une al Ca<sup>2+</sup> libre y es capaz de sensor concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico al ser excitado a cierta longitud de onda (488 nm), emitiendo fluorescencia a 525 nm cuando está unido a Ca<sup>2+</sup> (Barreto-Chang y Dolmatsch, 2009). Las mediciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico se realizaron en un microscopio invertido de fluorescencia, a través de un protocolo de registro de 4 minutos de duración con tiempos de captura de 1 segundo, en donde a los 30 segundos de registro se aplicó el estímulo con los distintos secretagogos: DMPP 50 µM; KCl 70 mM y Iono 10 µM, en presencia o ausencia de A74 10 µM. Se sembraron células en cubreobjeto de 25 mm pretratados con poli-L-lisina 1%. Los resultados fueron analizados en el programa NIS-Element Advanced Research 4.3 software (Nikon, Tokyo, Japan) e ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Los resultados se expresaron como promedio y error estándar. La estadística se realizó utilizando el programa GraphPad Prisma 5, comparando el estímulo con los agonistas, que en este caso sería: DMPP 50 µM, KCl 70 mM y Iono 10 µM, con el antagonista selectivo de P2X7, A74 10 µM. Se utilizó la prueba ANOVA de 1 vía con

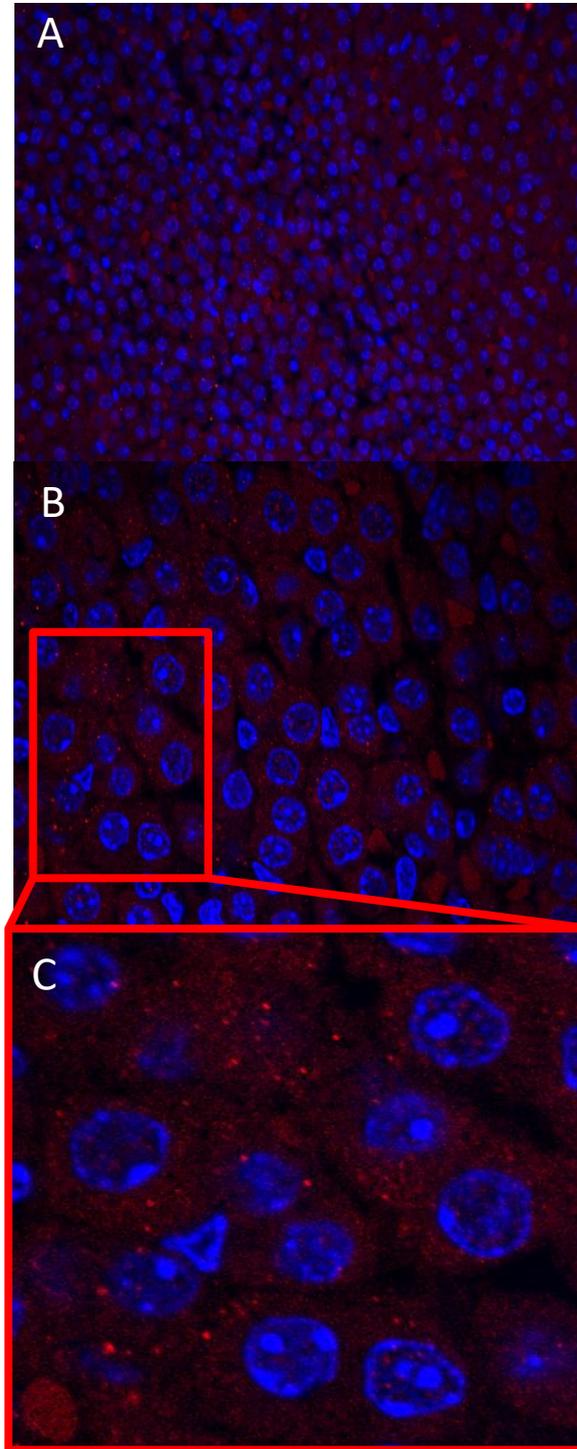
una prueba estadística de Kruskal Wallis, seguida de una prueba “post-hoc” de Dunn, con un intervalo de confianza del 95%.

## RESULTADOS

A continuación, se presentarán los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de investigación:

### **Identificación inmunohistoquímica de P2X7 en la glándula adrenal de ratón.**

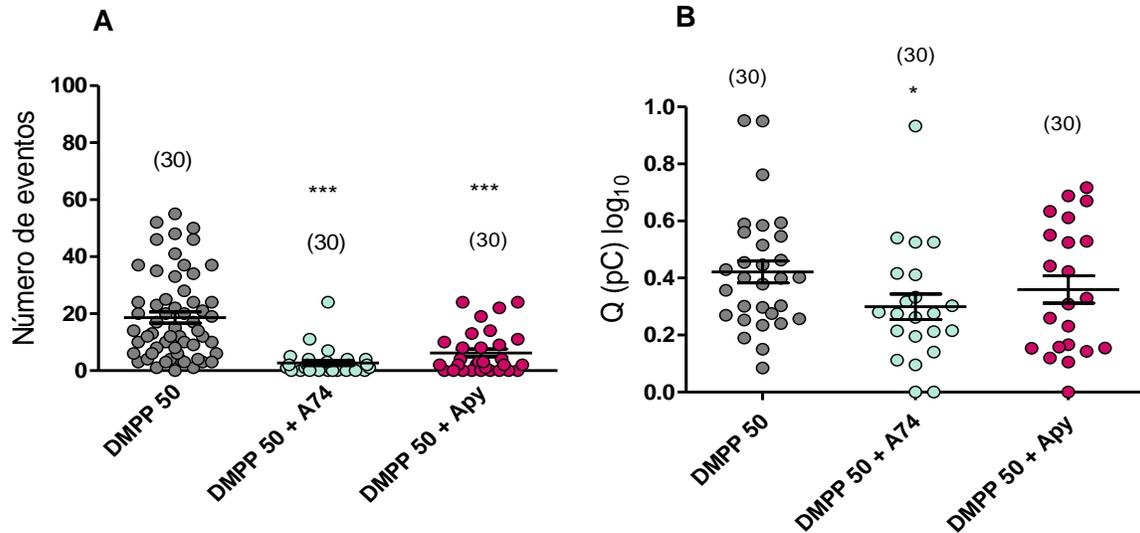
En la Figura 8 podemos observar la criosección de 25  $\mu\text{m}$  de la glándula adrenal de ratón completa, las cuales fueron inmunomarcadas con los anticuerpos de nuestro interés. El color rojo representa los P2X7 y en color azul podemos observar los núcleos de las células cromafines presentes en la microfotografía. En Figura 8A, podemos observar el inmunomarcaje rojo, que nos está señalando la presencia de P2X7 en células cromafines de ratón. En cuanto a la Figura 8B podemos ver una magnificación de la misma zona con un objetivo 100X, en donde podemos observar con mayor detalle el marcaje del P2X7. El recuadro rojo que se encuentra en esta parte de la figura corresponde a la amplificación. Esta amplificación se muestra en la Figura 8C, en donde podemos observar pequeños cúmulos de P2X7 en el citoplasma de las células cromafines de ratón.



**FIGURA 8:** Criosecciones de 25  $\mu\text{m}$  del tejido completo de glándula adrenal de ratón. El tejido se encuentra previamente fijado en PFA 4% durante 12 horas. Estas imágenes fueron obtenidas bajo un microscopio confocal. **A.** Criosección de

glándula adrenal murina obtenida con un objetivo 40X, en donde podemos observar el inmunomarcaje rojo, que nos indicaría la presencia de P2X7 en células cromafines. **B.** Corte observado con un objetivo de 100X. **C.** Magnificación de la zona en el recuadro de **B.** El recuadro rojo de la imagen B señala el lugar en donde se aplicó el aumento (imagen C). Esta imagen corresponde a un N=3. No fue aplicada ninguna prueba estadística en esta imagen.

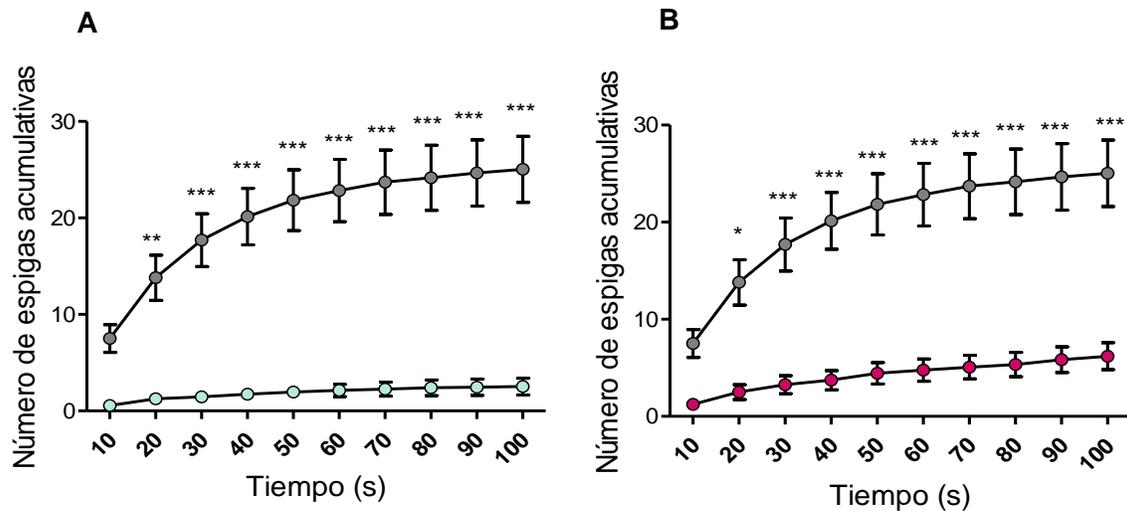
**Efecto de la degradación de ATP y el antagonismo del receptor P2X7 en la secreción inducida por la activación de los receptores nicotínicos.** Al estimular con un agonista de los receptores nicotínicos en presencia de A74 y Apy, podemos observar que el número de eventos se ve disminuido significativamente cuando DMPP se encuentra en presencia del antagonista selectivo de P2X7 y también sucede lo mismo en presencia de la enzima que hidroliza ATP, Apy (Figura 9A). En la Figura 9B en donde se encuentra graficado el área bajo la espiga, podemos observar que al estimular con DMPP en presencia de A74 hay una disminución significativa del área bajo la curva de cada espiga, parámetro llamado Q y que refleja la cantidad de catecolaminas liberadas desde una vesícula. Este resultado nos podría estar indicando que tanto ATP como el P2X7 son necesarios para que ocurran los eventos de exocitosis inducidos por la activación de los receptores nicotínicos.



**FIGURA 9:** Representación gráfica del número de eventos amperométricos y de Q, estimulando con DMPP 50  $\mu$ M. **A.** Número de eventos por condición. **B.** Área bajo la espiga o liberación cuantál de una vesícula por evento, Q. Se comparó la condición DMPP con DMPP + A74 y DMPP + Apy, utilizando la prueba estadística *t de student*. Se consideró una prueba no paramétrica, Prueba Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95%. Valor P < 0.0001 (\*\*\*) y Valor P = 0.0295 (\*). Los números que aparecen sobre la gráfica en **A y B.** indican el número de registros analizados. Número muestral de DMPP: 3 animales; DMPP + A74: 3 animales; DMPP + Apy: 3 animales y DMPP + Ctrl DMSO 1:1000 5 animales (no se muestra en la gráfica).

En la Figura 10 podemos observar los histogramas acumulativos de espigas amperométricas de cada registro. Cuando se estimula con DMPP, podemos presenciar una disminución abrupta de la sumatoria de espigas amperométricas en presencia de A74, además de ver una disminución similar cuando se estimula con

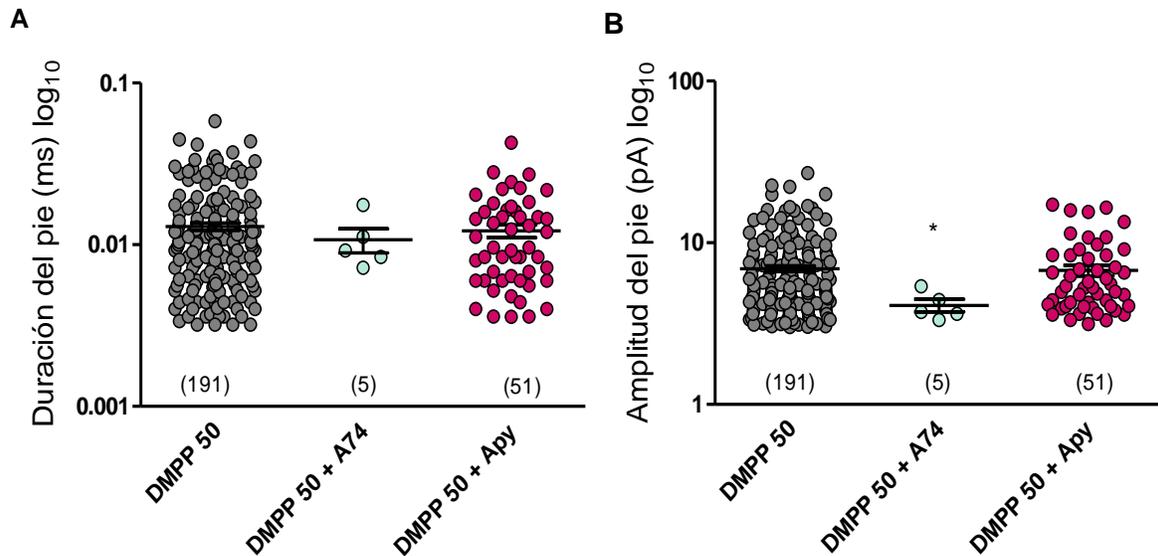
DMPP en presencia de Apy (Figura 10A y 10B, respectivamente). Este resultado nos estaría indicando que, a partir de los 20 segundos de registro, es decir, casi al comienzo de la estimulación con DMPP, la célula comienza a sufrir una disminución en la liberación de catecolaminas, probablemente como consecuencia del ATP liberado de cada evento de exocitosis y la consecuente activación de P2X7.



**FIGURA 10:** Histogramas acumulativos de espigas amperométricas inducidas con DMPP 50  $\mu$ M. Se realizó esta gráfica contando la cantidad de espigas amperométricas existentes por cada 10 segundos de registro. **A.** Se comparó la sumatoria de espigas amperométricas de las condiciones DMPP (color gris), DMPP + A74 (verde agua) y en **B.** de las condiciones DMPP (color gris) y DMPP + Apy (rosado oscuro). Para esta gráfica se utilizó la prueba estadística ANOVA de doble vía (Variables tiempo y cantidad de espigas) con una prueba posterior de *Bonferroni*, comparando la columna DMPP 50  $\mu$ M con las demás condiciones. Valor  $P < 0.05$  (\*); Valor  $P < 0.01$  (\*\*) y Valor  $P < 0.001$  (\*\*\*). Número muestral de DMPP: 3 animales; DMPP + A74: 3 animales; DMPP + Apy: 3 animales y DMPP + Ctrl DMSO 1:1000 5 animales (no se muestra en la gráfica).

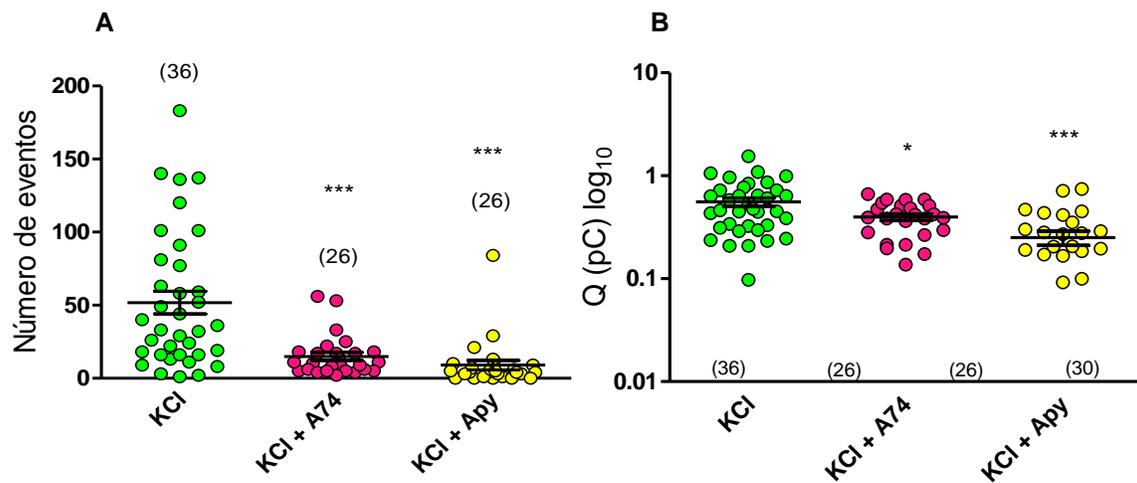
Se midió además la corriente pequeña que precede a la espiga amperométrica, la cual es llamada “pie” y que representa la salida de catecolaminas a través del poro de fusión, una estructura intermedia que se forma durante la exocitosis (Sharma y Lindau, 2018). La duración del pie refleja el tiempo en que el poro de fusión se mantiene como tal antes de expandirse, mientras que la amplitud del pie cuenta de su conductancia (Sharma y Lindau, 2018).

Podemos observar en la Figura 11 la duración de los pies, como en amplitud (pA). Esta señal que precede a la espiga no se observa cuando su duración es muy corta, por lo tanto, cabe destacar que se encuentran graficadas sólo las espigas que cumplían con las medidas señaladas con anterioridad. Ni A74 ni Apy afectaron la duración de los pies (Figura 11A), sugiriéndose que el poro de fusión no varió en estas condiciones. En cambio, A74 disminuyó significativamente la amplitud del pie, lo cual sugiere que los P2X7 podrían estar regulando la geometría del poro de fusión.



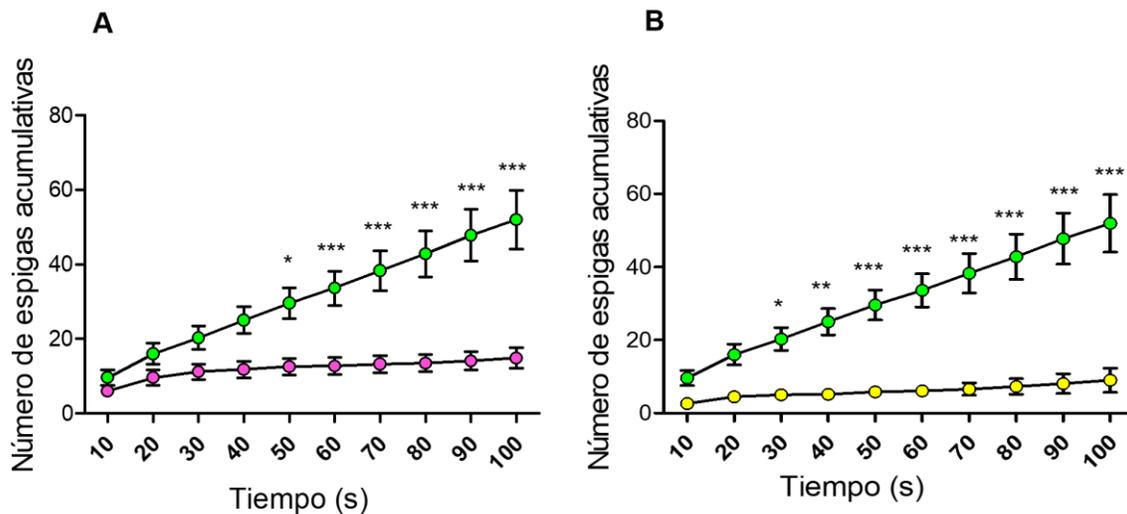
**FIGURA 11:** Duración y amplitud de pies amperométricos, estimulando con DMPP 50  $\mu$ M. **A.** duración (ms) y **B.** amplitud (pA). Se comparó la condición DMPP con DMPP + A74 y DMPP + Apy utilizando la prueba estadística *T de student* considerando una prueba no paramétrica, Prueba Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%. Valor P = 0.0437 (\*). Los números que aparecen tanto en la gráfica A como en B, representan el número de pies presentes en todos los registros analizados. Número muestral de DMPP: 3 animales; DMPP + A74: 3 animales; DMPP + Apy: 3 animales y DMPP + Ctrl DMSO 1:1000: 5 animales (no se muestra en la gráfica).

**Efecto de la degradación de ATP y el antagonismo del receptor P2X7 en la secreción inducida por estímulo depolarizante.** Al estimular con altas concentraciones de KCl extracelular, estamos provocando una despolarización de la membrana, culminando con la exocitosis de vesículas por parte de las células cromafines. En la Figura 12A podemos observar que al estimular con KCl 70 mM en presencia de A74 y Apy disminuyen el número de eventos amperométricos. La presencia de ambas drogas también disminuye la liberación cuantales Q, indicando que se liberan menos catecolaminas durante cada evento individual de exocitosis.



**FIGURA 12:** Representación gráfica del número de eventos amperométricos y de Q, estimulando con KCl 70 mM. **A.** Número de eventos por condición. **B.** Área bajo la espiga o liberación cuantales por evento, (Q). Se comparó la condición KCl con KCl + A74 y KCl + Apy utilizando la prueba estadística *t de student* considerando una prueba no paramétrica, Prueba Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%. Valor P < 0.0001 (\*\*\*) y Valor P = 0.0453 (\*). Los números que aparecen sobre la gráfica en **A y B.** indican el número de registros analizados. Número muestral de KCl: 4 animales; KCl + A74: 3 animales; KCl + Apy: 3 animales y KCl + Ctrl DMSO 1:1000: 3 animales (no se muestra en la gráfica).

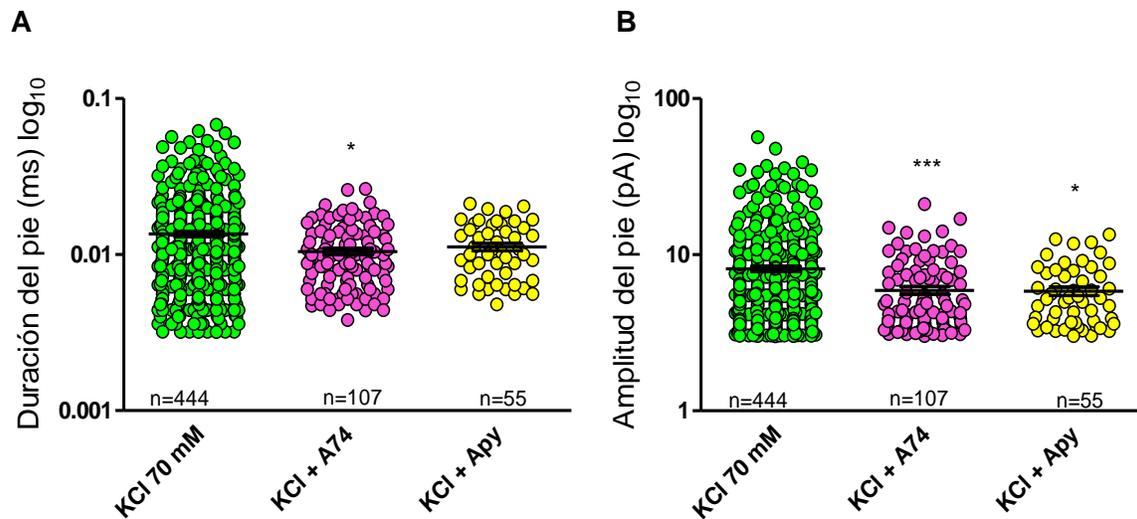
Continuando con los resultados, en la Figura 13 se observan los histogramas acumulativos de espigas amperométricas, observándose una disminución de la sumatoria de espigas cuando las células son pretratadas con A74 y Apy (Figura 13A y 13B, respectivamente). En presencia de A74 el número de espigas amperométricas comienza a disminuir a los 50 segundos y con Apy la disminución es a partir de los 30 segundos. El resultado de estos análisis podría indicarnos que el ATP liberado podría estar actuando como un mecanismo de autorregulación de la exocitosis.



**FIGURA 13:** Histogramas acumulativos de espigas amperométricas inducidas con KCl 70 mM. Se realizó esta gráfica contando la cantidad de espigas amperométricas existentes por cada 10 segundos de registro. **A.** Se comparó la sumatorio de espigas amperométricas en las condiciones KCl 70 mM (color verde fluor) con KCl 70 mM + A74 (color fucsia) y en **B.** las condiciones KCl 70 mM (color verde fluor) + Apy (amarillo). Para esta gráfica se utilizó la prueba estadística ANOVA de doble vía (Variables tiempo y cantidad de espigas) con una prueba posterior de *Bonferroni*, comparando la columna KCl 70 mM con las demás condiciones. Valor P < 0.001

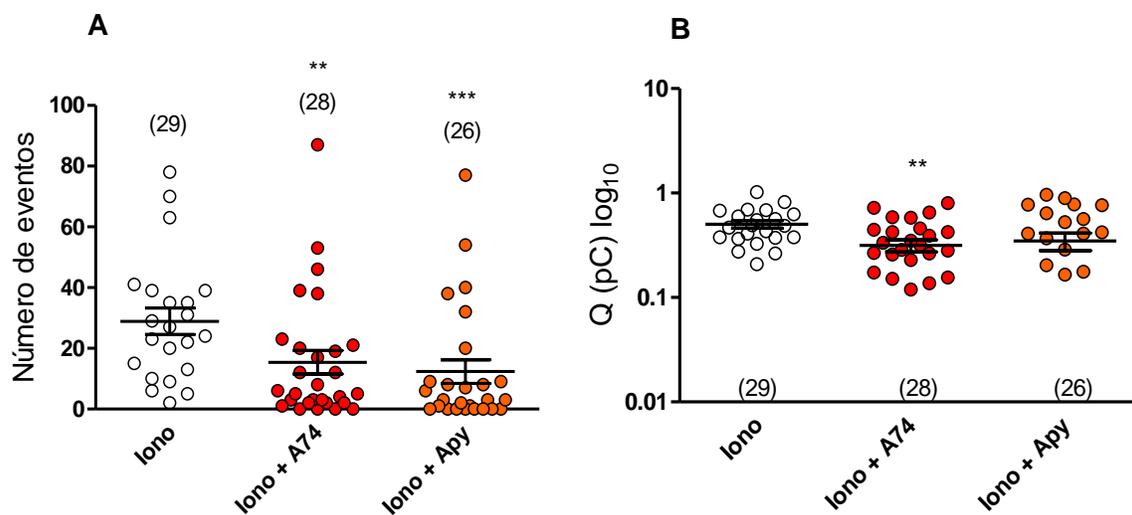
(\*\*\*); Valor  $P < 0.01$  (\*\*) y Valor  $P < 0.05$  (\*). Número muestral de KCl: 4 animales; KCl + A74: 3 animales; KCl + Apy: 3 animales y KCl + Ctrl DMSO 1:1000: 3 animales (no se muestra en la gráfica).

Nuestro análisis también muestra que A74 disminuye significativamente la duración de los pies (Figura 14A), sugiriendo que frente a este estímulo (despolarización de la membrana con altas concentraciones de KCl extracelular), el P2X7 regula la expansión del poro de fusión. Por otra parte, la amplitud de los pies se ve afectada tanto con A74 y Apy, indicando que tanto el ATP liberado como la activación de P2X7 también podría afectar la geometría del poro de fusión y, por ende, su conductancia.



**FIGURA 14:** Duración y amplitud de pies amperométricos estimulando con KCl 70 mM. **A.** duración (ms) y **B.** amplitud (pA). Se comparó la condición KCl 70 mM con KCl 70 mM + A74 y KCl 70 mM + Apy utilizando la prueba estadística *t de student* considerando una prueba no paramétrica, Prueba Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%. Valor P = 0.0244 (\*) y Valor P = 0.0006 (\*\*\*). Los números que aparecen tanto en la gráfica A como en B, representan el número de pies presentes en todos los registros analizados. Número muestral de KCl: 4 animales; KCl + A74: 3 animales; KCl + Apy: 3 animales y KCl + Ctrl DMSO 1:1000: 3 animales (no se muestra en la gráfica).

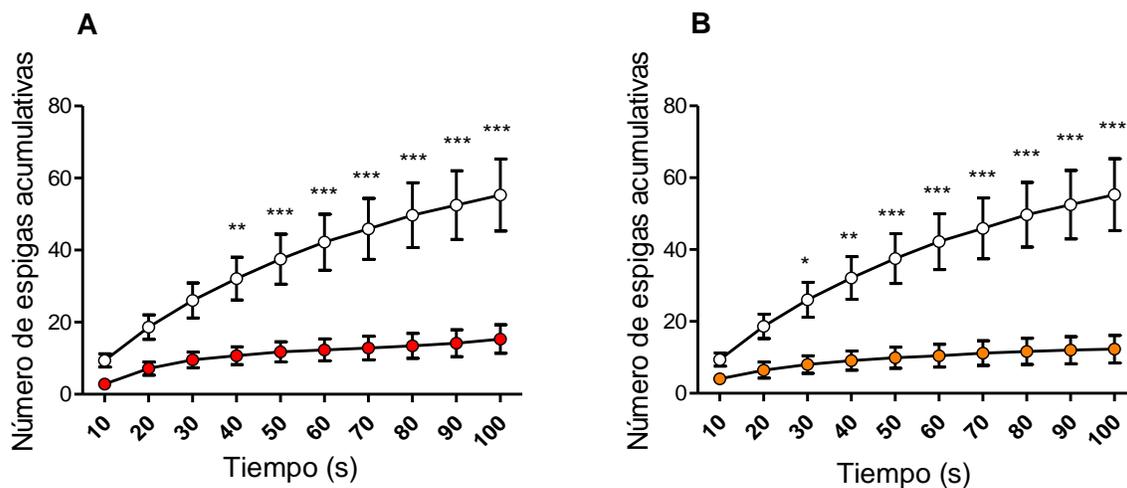
**Efecto del antagonismo del receptor P2X7 sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducido por un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Cuando estimulamos con un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , molécula que se intercala en la membrana celular, aumenta la permeabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$ , por ende, hay un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Elzi et al, 2001). Cuando se estimuló con esta droga se observó que el número de eventos disminuye en presencia del antagonista (A74) y de la enzima que hidroliza ATP (Apy), lo que nos estaría indicando que, en presencia de estos inhibidores, la cantidad de eventos amperométricos y la liberación cuantál ( $Q$ ) de catecolaminas se ve disminuida (Figura 15B).



**FIGURA 15:** Representación gráfica del número de eventos amperométricos y de  $Q$ , estimulando con Ionomicina  $10 \mu\text{M}$ . **A.** Número de eventos por condición. **B.** Área bajo la espiga o liberación cuantál de una vesícula por evento,  $Q$ . Se comparó la condición Iono con Iono + A74 y Iono + Apy utilizando la prueba estadística  $T$  de student considerando una prueba no paramétrica, Prueba Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%. Valor  $P = 0.0005$  (\*\*\*), Valor  $P = 0.0031$  y Valor  $P = 0.0366$  (\*). Los números que aparecen sobre la gráfica en **A y B.** indican el número

de registros analizados. Número muestral de Iono: 3 animales; Iono + A74: 3 animales; Iono + Apy: 3 animales y Iono + Ctrl DMSO 1:1000: 4 animales (no se muestra en la gráfica).

En los histogramas de espigas amperométricas podemos observar que la presencia de A74 y Apy disminuyen la cantidad de espigas acumulativas (Figura 16A y 16B). Esta disminución comienza a tener una disminución significativa a los 40 segundos de registro en el caso de A74 y con Apy el cambio significativo comenzó a los 30 segundos.

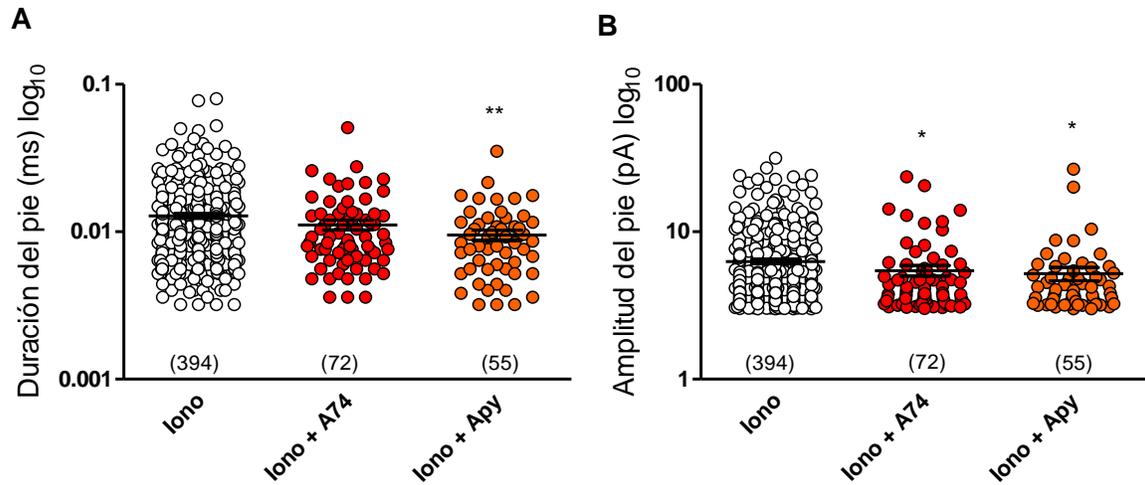


**FIGURA 16:** Histogramas acumulativos de espigas amperométricas inducidas con Ionomicina 10  $\mu$ M. Se realizó esta gráfica contando la cantidad de espigas amperométricas existentes por cada 10 segundos de registro. **A.** Se comparó el sumatorio de espigas acumulativas de las condiciones Iono (color blanco) con Iono + A74 (color rojo) y en **B.** de las condiciones Iono (color blanco) y Iono + Apy (color naranja). Para esta gráfica se utilizó la prueba estadística ANOVA de doble vía

(Variables tiempo y cantidad de espigas) con una prueba posterior de *Bonferroni*, comparando la columna KCl 70 mM con las demás condiciones. Valor P < 0.05 (\*); Valor P < 0.01 (\*\*) y Valor P < 0.001 (\*\*\*). Número muestral de Iono: 3 animales; Iono + A74: 3 animales; Iono + Apy: 3 animales y Iono + Ctrl DMSO 1:1000: 4 animales (no se muestra en la gráfica).

Finalmente, para esta condición, podemos observar en la Figura 17 la duración de los pies, tanto en tiempo, como en amplitud al estimular con Iono.

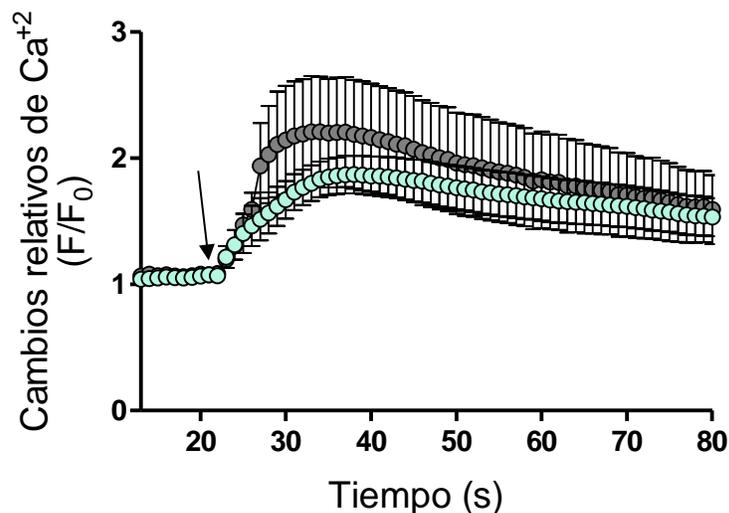
Para la duración de los pies (Figura 17A), podemos observar una disminución sólo en presencia de Apy. En cambio, cuando se analiza la amplitud de este parámetro (Figura 17B), se observa una disminución significativa tanto en presencia de A74 como de Apy. Esto podría sugerir que otros receptores purinérgicos participan en la regulación del poro de fusión.



**FIGURA 17:** Duración y amplitud de los pies amperométricos estimulando con Ionomicina 10  $\mu$ M. Se comparó la condición Iono con Iono + A74 y Iono + Apy utilizando la prueba estadística *t de student* considerando una prueba no paramétrica, Prueba Mann-Whitney, con un intervalo de confianza del 95%. Valor P = 0.0012 (\*\*) y Valor P = 0.0177 (\*). Los números que aparecen tanto en la gráfica A como en B, representan el número de pies presentes en todos los registros analizados. Número muestral de Iono: 3 animales; Iono + A74: 3 animales; Iono + Apy: 3 animales y Iono + Ctrl DMSO 1:1000: 4 animales (no se muestra en la gráfica).

**Medición de señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.** En estos experimentos se quiere estudiar el efecto de la inhibición del P2X7 sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicas en células cargadas con Fluo4-AM. Los experimentos se realizaron siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, estimulando a una longitud de onda de 488 nm.

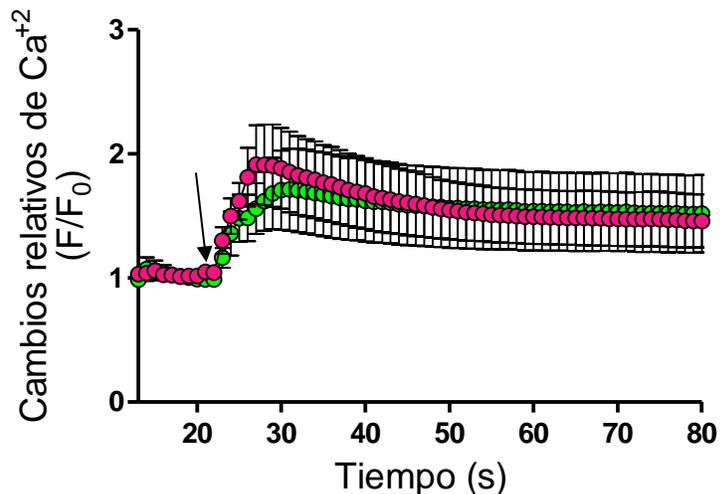
**Efecto del antagonismo del receptor P2X7 sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducida por la activación de los receptores nicotínicos.** Al estimular las células cromafines en cultivo primario con DMPP 50  $\mu\text{M}$ , podemos observar que hay un aumento transitorio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el cual no se afecta significativamente cuando se estimulan las células en presencia de A74 (Figura 18).



**FIGURA 18:** Mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células cargadas con Fluo4-AM, estimulando con DMPP 50  $\mu\text{M}$ . DMPP (en gris) y DMPP+ A74 (en verde agua). La flecha negra señala cuando fue aplicado el estímulo. Anterior a esto se muestra la línea base del registro. Se utilizó la prueba ANOVA de 1 vía con una prueba estadística de Kruskal Wallis, seguida de una prueba “post-hoc” de Dunn, con un

intervalo de confianza del 95%. Número muestral de DMPP: 5 animales y 14 células; DMPP + A74: 3 animales y 10 células y DMPP + Ctrl DMSO 1:1000: 5 animales y 12 células (no se muestra en la gráfica).

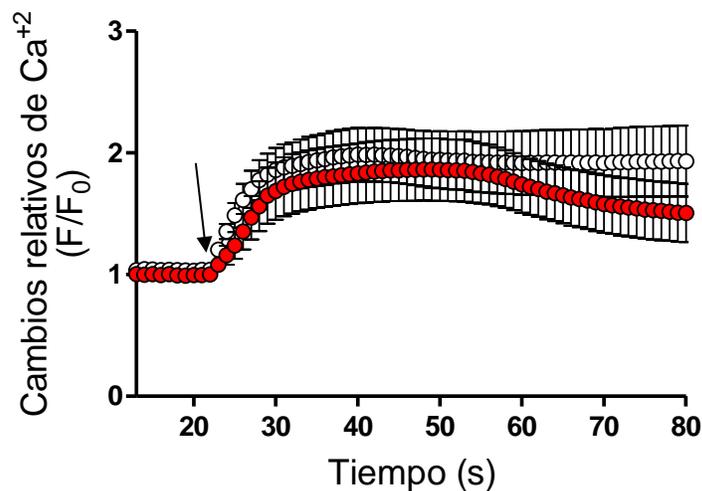
**Efecto del antagonismo del receptor P2X7 sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducida por la despolarización de la membrana.** Al estimular las células cromafines de cultivo primario con KCl 70 mM, se observa un aumento transitorio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el cual no se afecta significativamente cuando se estimulan las células en presencia de A74 (Figura 19).



**FIGURA 19:** Mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células cargadas con Fluo4-AM, estimulando con KCl 70 mM. KCl 70 mM (en verde) y KCl 70 mM + A74 (en fucsia). La flecha negra señala en donde fue aplicado el estímulo. Anterior a esto se muestra la línea base del registro. Se utilizó la prueba ANOVA de 1 vía con una prueba estadística de Kruskal Wallis, seguida de una prueba “post-hoc” de Dunn, con un

intervalo de confianza del 95%. Número muestral de KCl: 4 animales y 8 células; KCl + A74: 5 animales y 12 células y KCl + Ctrl DMSO 1:1000: 5 animales y 11 células (no se muestra en la gráfica).

**Efecto del antagonismo del receptor P2X7 sobre las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico inducido por un ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Al estimular las células cromafines de cultivo primario con Iono, podemos observar un aumento transitorio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, el cual se afecta negativamente en presencia de A74 sólo al final del registro, indicándonos que el P2X7 podría tener algún efecto “tardío” en la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Figura 20).



**FIGURA 20:** Mediciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en células cargadas con Fluo4-AM, estimulando con Iono 10  $\mu\text{M}$ . Iono (en blanco) con Iono + A74 (en rojo). La flecha negra señala en donde fue aplicado el estímulo. Anterior a esto se muestra la línea base del registro. Se utilizó la prueba ANOVA de 1 vía con una prueba estadística de Kruskal Wallis, seguida de una prueba “post-hoc” de Dunn, con un intervalo de

confianza del 95%. Número muestral de Iono: 3 animales y 7 células; Iono + A74: 6 animales y 8 células y Iono + Ctrl DMSO 1:1000: 4 animales y 9 células (no se muestra en la gráfica).

## DISCUSION

### **Identificación inmunohistoquímica de receptores p2x7 en la glándula adrenal de ratón.**

Los resultados obtenidos dan cuenta que el receptor purinérgico P2X7 se encuentra presente en células cromafines de la glándula adrenal de ratón. Estudios previos demostraron la presencia de este receptor en células cromafines de rata que componen la médula adrenal (Arribas-Blázquez et al, 2019), además este receptor se encuentra en parte de la corteza de la glándula adrenal de ratón (Afework y Burnstock, 1999; Arribas-Blázquez et al, 2019). También fue observado este tipo de receptor en células PC12, una línea celular derivada de un feocromocitoma (tumor) de la médula adrenal de rata (Fan et al, 2014).

En la Figura 5 podemos observar que el inmunomarcaje de color rojo (P2X7) se encuentra presente en toda el área de la célula, y en algunos lugares, dentro de la misma célula, se observan cúmulos. Estas poblaciones de P2X7 lograron identificarse como tal, ya que esta marca sólo se ve en el canal rojo y no compone un artefacto de la técnica, como la auto fluorescencia o mal manejo de la técnica. Esto nos podría estar indicando que este receptor se encuentra distribuido de manera heterogénea en el tejido de la médula adrenal, es decir, en ciertos sectores de la célula hay mayor presencia del receptor que en otras zonas de esta cromafín. Estudios diversos señalan que la presencia y densidad de receptores purinérgicos

es dependiente de la especie (Liu et al, 1999; Dunn et al, 2001). Esto lo pudimos observar, ya que un estudio realizado en nuestro laboratorio en el presente año (Maldifassi et al, 2021) se realizó una inmunocitoquímica de cromafín de bovino aislada, en donde el receptor se encuentra mayormente confinado a la membrana plasmática de esta.

### **Participación del P2X7 en la liberación de catecolaminas en cultivo primario de células cromafines.**

Nuestros resultados muestran que tanto la hidrólisis del ATP liberado con Apy 2U/mL como el antagonismo del P2X7 con A74 disminuyen significativamente el número de eventos de exocitosis inducidos por DMPP 50  $\mu$ M, KCl 70 mM o Iono 10  $\mu$ M. Por lo tanto, en este trabajo planteamos que este receptor potencia la actividad de exocitosis en las células cromafines. Uno de los mecanismos propuestos es que al liberarse catecolaminas y ATP (en altas concentraciones) de los gránulos cromafines, este ATP se une al receptor en cuestión y mediante una cascada de señalizaciones que desconocemos o por la entrada de grandes moléculas a través de la formación de poros el P2X7 estaría potenciando a que más vesículas sean liberadas a partir de las células cromafines (Pelegri y Surprenent, 2006; Ugur y Ugur, 2019).

Se han propuesto tres mecanismos de acción para P2X7 hasta la fecha: (1) como un canal iónico regulado por ligando que, al ser estimulado, aumenta la permeabilidad a pequeñas moléculas catiónicas, llevando a una despolarización de la membrana celular; (2) cuando se estimula de manera prolongada, este receptor puede aumentar gradualmente su permeabilidad a moléculas grandes, lo que puede llevar a la absorción o pérdida de moléculas grandes, como nucleótidos y (3) a través de interacciones directas con su C-terminal, puede activar proteínas de transducción de señales y/o procesos celulares (Ugur y Ugur, 2019).

Cuando estimulamos con los diversos secretagogos en presencia de A74, el antagonista de P2X7 se pueden observar que hay eventos de exocitosis, pero estos se presentan en menor proporción que en ausencia de A74 (observado en las Figuras 9, 12 y 15), ya que se liberan vesículas desde la célula cromafín hacia el medio extracelular, pero la autorregulación positiva mediada por el P2X7 se encuentra antagonizada por A74. Algo similar sucede cuando incubamos un Apy, esta enzima degrada gran parte del ATP que se encuentra en el medio extracelular, se estimula en presencia de Apy y observamos que el número de histogramas acumulativos de espigas amperométricas va disminuyendo, ya que la enzima degrada las moléculas de ATP que se van liberando mediante la exocitosis, quedando una concentración de ATP fuera de la célula por debajo del umbral de activación de P2X7.

## Efecto del antagonismo de P2X7 sobre las señales de Ca<sup>2+</sup>

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el antagonismo del P2X7 con A74 no disminuye significativamente las señales de Ca<sup>2+</sup> citosólico inducidas con DMPP 50  $\mu$ M, altas concentraciones de KCl (70 mM) y por un ionóforo de Ca<sup>2+</sup>, Iono 10  $\mu$ M. Esto nos podría estar indicando que los cambios en las señales de Ca<sup>2+</sup> medidas con esta técnica no fueron lo suficientemente sensibles para detectar cambios significativos o bien, este receptor se encuentra en zonas localizadas en la célula cromafín y autorregula la exocitosis desde zonas específicas. Proponemos repetir este estudio, pero utilizando otra técnica de microscopía, TIRFm (del inglés *total internal fluorescence microscope*), en donde podremos observar una pequeña región de la célula con un espesor no mayor a 200 nm. Con esta técnica esperamos observar mayores cambios en las variaciones de Ca<sup>2+</sup>, ya que estaremos midiendo variaciones de Ca<sup>2+</sup> submembranal, enfocándonos en la membrana de la célula y podremos obtener más información de lo que está sucediendo exclusivamente en la membrana de la célula cromafín y no en la célula completa (Oheim et al, 2019).

Un estudio realizado por Tomé et al (2007), en donde se evaluó un potencial agonista de los receptores purinérgicos del tipo P2X, en células cromafines bovinas, en donde la respuesta a Ca<sup>2+</sup> al ATP fueron de aproximadamente el 50% y entre este 50% hubo un 40% que produjo respuestas positivas a 2-MeSATP. Lo que nos podría indicar este trabajo es que puede suceder algo similar a lo que sucede con las cromafines bovinas, que sólo una fracción de cromafines aisladas de ratón se pueda estar inhibiendo con A74 y la otra fracción restante, puede no estar viéndose

afectada. Para corroborar esto, se pretende replicar algunas técnicas de este trabajo con cromafines de ratón para verificar si se cumple o no el mismo patrón mencionado en el estudio.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación nos permiten concluir lo siguiente:

El receptor purinérgico del tipo P2X7 se encuentra presente en el tejido completo de la glándula adrenal de ratón, específicamente en las células cromafines que se encuentran en la médula adrenal y tienen una distribución en cúmulos dentro del citoplasma de la célula.

Al evaluar los efectos de la degradación de ATP y el antagonismo de los receptores P2X7 sobre el número de eventos de exocitosis podemos concluir que tanto el ATP, como los P2X7 son necesarios para que el proceso de exocitosis se autorregule, ya que, al inducir la liberación de catecolaminas con los diversos secretagogos en presencia de Apy y A74 se observó que estos participaron significativamente en la regulación del poro de fusión, afectándolo tanto en la duración, amplitud y en la unión vesícula-membrana. Además, se observó que la presencia de Apy y A74 afecta la autorregulación positiva de la exocitosis, puesto que en presencia de estas moléculas disminuyen los eventos de exocitosis.

Al determinar el efecto del antagonista A74, sobre las señales de  $Ca^{2+}$  citosólico no se vieron afectadas de manera significativa, ya que en ausencia de A74 hubo aumentos transitorios de  $Ca^{2+}$ , pero no representaron cambios significativos. No se descarta la hipótesis de que esta autorregulación sea mediada por  $Ca^{2+}$ . Se sugiere

realizar experimentos para observar si las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  estarían a nivel de membrana.

## REFERENCIA

- Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?. *Pharmacology & therapeutics*, 64(3), 445–475. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(94\)00048-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(94)00048-4)
- Afework, M., & Burnstock, G. (1999). Distribution of P2X receptors in the rat adrenal gland. *Cell and tissue research*, 298(3), 449–456. <https://doi.org/10.1007/s004419900103>.
- Albillos, A., & McIntosh, J. M. (2018). Human nicotinic receptors in chromaffin cells: characterization and pharmacology. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 470(1), 21–27. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2073-0>
- Ardiles, A. O., Maripillán, J., Lagos, V. L., Toro, R., Mora, I. G., Villarroel, L., Alés, E., Borges, R., & Cárdenas, A. M. (2006). A rapid exocytosis mode in chromaffin cells with a neuronal phenotype. *Journal of neurochemistry*, 99(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04080.x>
- Arribas-Blázquez, M., Olivos-Oré, L. A., Barahona, M. V., Sánchez de la Muela, M., Solar, V., Jiménez, E., Gualix, J., McIntosh, J. M., Ferrer-Montiel, A., Miras-Portugal, M. T., & Artalejo, A. R. (2019). Overexpression of P2X3 and P2X7 Receptors and TRPV1 Channels in Adrenomedullary Chromaffin Cells in a Rat Model of Neuropathic Pain. *International journal of molecular sciences*,

20(1), 155. <https://doi.org/10.3390/ijms20010155>.

Artalejo, A. R., & Olivos-Oré, L. A. (2018). Alpha2-adrenoceptors in adrenomedullary chromaffin cells: functional role and pathophysiological implications. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 470(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2059-y>.

Arulkumaran, N., Unwin, R. J., & Tam, F. W. (2011). A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(7), 897–915. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.578068>.

Barreto-Chang, O. L., & Dolmetsch, R. E. (2009). Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (23), 1067. <https://doi.org/10.3791/1067>.

Berger, I., Werdermann, M., Bornstein, S. R., & Steenblock, C. (2019). The adrenal gland in stress - Adaptation on a cellular level. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 190, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.006>.

Brandan, N., Llanos, I., Ruiz, D. A. N. D., & Rodríguez, A. (2010). Hormonas Catecolamínicas Adrenales. *Cátedra de Bioquímica Facultad de Medicina*. [acceso: 4 de abril de 2015]. URL:

[http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera  
Medicina/BIOQUIMICAtecolaminas.pdf](http://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera%20Medicina/BIOQUIMICAtecolaminas.pdf).

Bjelobaba, I., Janjic, M. M., & Stojilkovic, S. S. (2015). Purinergic signaling pathways in endocrine system. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 191, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.04.010>.

Boeynaems, J. M., Communi, D., Gonzalez, N. S., & Robaye, B. (2005). Overview of the P2 receptors. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 31(2), 139–149. <https://doi.org/10.1055/s-2005-869519>.

Boumechache, M., Masin, M., Edwardson, J. M., Górecki, D. C., & Murrell-Lagnado, R. (2009). Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(20), 13446–13454. <https://doi.org/10.1074/jbc.M901255200>.

Borges R. (2013). The ATP or the natural history of neurotransmission. *Purinergic signalling*, 9(1), 5–6. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9330-7>.

Burnstock G. (2011). Introductory overview of purinergic signalling. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3, 896–900. <https://doi.org/10.2741/e298>.

Burnstock, G., & Kennedy, C. (2011). P2X receptors in health and disease.

Advances in pharmacology (San Diego, Calif.), 61, 333–372.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00011-4>.

Burnstock G. (2014). Purinergic signalling in endocrine organs. *Purinergic signalling*, 10(1), 189–231. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9396-x>.

Calvo. Enrique, (2015). Alteraciones de la cinética del poro de fusión excitotóxico en células cromafines de modelos murinos de enfermedades neurodegenerativas. Tesis para optar al grado de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid, España

Cattaneo M. (2006). ADP receptors: inhibitory strategies for antiplatelet therapy. *Timely topics in medicine. Cardiovascular diseases*, 10, E22.

Craigie, E., Birch, R. E., Unwin, R. J., & Wildman, S. S. (2013). The relationship between P2X4 and P2X7: a physiologically important interaction?. *Frontiers in physiology*, 4, 216. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00216>.

Chern, Y. J., Herrera, M., Kao, L. S., & Westhead, E. W. (1987). Inhibition of catecholamine secretion from bovine chromaffin cells by adenine nucleotides and adenosine. *Journal of neurochemistry*, 48(5), 1573–1576.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1987.tb05703.x>

Chern, Y. J., Kim, K. T., Slakey, L. L., & Westhead, E. W. (1988). Adenosine

receptors activate adenylate cyclase and enhance secretion from bovine adrenal chromaffin cells in the presence of forskolin. *Journal of neurochemistry*, 50(5), 1484–1493. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb03034.x>.

Amatore, C., Arbault, S., Bonifas, I., Guille, M., Lemaître, F., & Verchier, Y. (2007). Relationship between amperometric pre-spike feet and secretion granule composition in chromaffin cells: an overview. *Biophysical chemistry*, 129(2-3), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.05.018>.

Cocchia, D., & Michetti, F. (1981). S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell and tissue research*, 215(1), 103–112. <https://doi.org/10.1007/BF00236252>.

Costa-Junior, H. M., Sarmiento Vieira, F., & Coutinho-Silva, R. (2011). C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic signalling*, 7(1), 7–19. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9215-1>.

Criado M. (2018). Acetylcholine nicotinic receptor subtypes in chromaffin cells. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 470(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2050-7>.

Alvarez de Toledo, G., Fernández-Chacón, R., & Fernández, J. M. (1993). Release

of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature*, 363(6429), 554–558. <https://doi.org/10.1038/363554a0>.

Di Lorenzo, M., Barra, T., Rosati, L., Valiante, S., Capaldo, A., De Falco, M., & Laforgia, V. (2020). Adrenal gland response to endocrine disrupting chemicals in fishes, amphibians and reptiles: A comparative overview. *General and comparative endocrinology*, 297, 113550. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113550>.

Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Han, P., & Jarvis, M. F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British journal of pharmacology*, 157(7), 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x>.

Domínguez, N., Rodríguez, M., Machado, J. D., & Borges, R. (2012). Preparation and culture of adrenal chromaffin cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 846, 223–234. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_20).

Dunn, J., & Grider, M. H. (2021). Physiology, Adenosine Triphosphate. In StatPearls. StatPearls Publishing.

Dunn, P. M., Zhong, Y., & Burnstock, G. (2001). P2X receptors in peripheral neurons. *Progress in neurobiology*, 65(2), 107–134. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(01\)00005-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(01)00005-3).

Ennion, S. J., Powell, A. D., & Seward, E. P. (2004). Identification of the P2Y<sub>12</sub> receptor in nucleotide inhibition of exocytosis from bovine chromaffin cells. *Molecular pharmacology*, 66(3), 601–611. <https://doi.org/10.1124/mol.104.000224>.

Elzi, D. J., Bjornsen, A. J., MacKenzie, T., Wyman, T. H., & Silliman, C. C. (2001). Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *American journal of physiology. Cell physiology*, 281(1), C350–C360. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.1.C350>.

Fan, B., Liu, S., Xu, C., Liu, J., Kong, F., Li, G., Zhang, C., Gao, Y., Xu, H., Yu, S., Zheng, C., Peng, L., Song, M., Wu, B., Lv, Q., Zou, L., Ying, M., Zhang, X., & Liang, S. (2014). The role of P2X<sub>7</sub> receptor in PC12 cells after exposure to oxygen-glucose deprivation. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 185, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.03.006>.

Fathali, H., & Cans, A. S. (2018). Amperometry methods for monitoring vesicular quantal size and regulation of exocytosis release. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 470(1), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2069-9>.

Geraghty NJ, Watson D, Adhikary SR, Sluyter R (2017) P2X<sub>7</sub> receptor in skin

biology and diseases. *World Journal Dermatology* 5:72–83.

Gicquel, T., Le Daré, B., Boichot, E., & Lagente, V. (2017). Purinergic receptors: new targets for the treatment of gout and fibrosis. *Fundamental & clinical pharmacology*, 31(2), 136–146. <https://doi.org/10.1111/fcp.12256>.

Harkins, A. B., & Fox, A. P. (2000). Activation of purinergic receptors by ATP inhibits secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Brain research*, 885(2), 231–239. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02952-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02952-8).

Hernández-Guijo, J. M., Carabelli, V., Gandía, L., García, A. G., & Carbone, E. (1999). Voltage-independent autocrine modulation of L-type channels mediated by ATP, opioids and catecholamines in rat chromaffin cells. *The European journal of neuroscience*, 11(10), 3574–3584. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00775.x>.

Karasawa, A., & Kawate, T. (2016). Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife*, 5, e22153. <https://doi.org/10.7554/eLife.22153>.

Kempná, P., & Flück, C. E. (2008). Adrenal gland development and defects. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 22(1), 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.07.008>.

Lee, J. C., & Hook, V. (2009). Proteolytic fragments of chromogranins A and B

represent major soluble components of chromaffin granules, illustrated by two-dimensional proteomics with NH(2)-terminal Edman peptide sequencing and MALDI-TOF MS. *Biochemistry*, 48(23), 5254–5262. <https://doi.org/10.1021/bi9002953>.

Li, S., Bjelobaba, I., Yan, Z., Kucka, M., Tomic, M., & Stojilkovic, S. S. (2011). Expression and roles of pannexins in ATP release in the pituitary gland. *Endocrinology*, 152(6), 2342–2352. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1216>.

Liu, M., Dunn, P. M., King, B. F., & Burnstock, G. (1999). Rat chromaffin cells lack P2X receptors while those of the guinea-pig express a P2X receptor with novel pharmacology. *British journal of pharmacology*, 128(1), 61–68. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702790>.

Marengo, F. D., & Cárdenas, A. M. (2018). How does the stimulus define exocytosis in adrenal chromaffin cells?. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 470(1), 155–167. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2052-5>.

Maldifassi, M. C., Momboisse, F., Guerra, M. J., Vielma, A. H., Maripillán, J., Báez-Matus, X., Flores-Muñoz, C., Cádiz, B., Schmachtenberg, O., Martínez, A. D., & Cárdenas, A. M. (2021). The interplay between  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors, pannexin-1 channels and P2X7 receptors elicit exocytosis in chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 157(6), 1789–1808. <https://doi.org/10.1111/jnc.15186>.

- Miller W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine reviews*, 9(3), 295–318. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-3-295>.
- Mori, M., Tsushima, H., & Matsuda, T. (1994). Antidiuretic effects of ATP induced by microinjection into the hypothalamic supraoptic nucleus in water-loaded and ethanol-anesthetized rats. *Japanese journal of pharmacology*, 66(4), 445–450. <https://doi.org/10.1254/jjp.66.445>.
- North R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews*, 82(4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>.
- Oheim, M., Salomon, A., Weissman, A., Brunstein, M., & Becherer, U. (2019). Calibrating Evanescent-Wave Penetration Depths for Biological TIRF Microscopy. *Biophysical journal*, 117(5), 795–809. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.048>.
- Overgaard, K., Torp-Pedersen, C., & Thorn, N. A. (1979). ATP-induced release of vasopressin from isolated bovine neurohypophyseal secretory granules. Dependency on chloride and effects of analogues of ATP. *Acta endocrinologica*, 90(4), 609–615. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0900609>.
- Park, J. H., & Kim, Y. C. (2017). P2X7 receptor antagonists: a patent review (2010–2015). *Expert opinion on therapeutic patents*, 27(3), 257–267.

<https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1246538>.

Pacak, Karel (2016). Endocrinology: Adult and Pediatric || Pheochromocytoma, 1902–1930.e6. doi:10.1016/B978-0-323-18907-1.00110-4.

Pelegrin, P., & Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. The EMBO journal, 25(21), 5071–5082. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601378>.

Rajendran, M., Dane, E., Conley, J., & Tantama, M. (2016). Imaging Adenosine Triphosphate (ATP). The Biological bulletin, 231(1), 73–84. <https://doi.org/10.1086/689592>.

Sluyter R. (2017). The P2X7 Receptor. Advances in experimental medicine and biology, 1051, 17–53. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2017\\_59](https://doi.org/10.1007/5584_2017_59).

Stevens, D. R., Schirra, C., Becherer, U., & Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. Frontiers in synaptic neuroscience, 3, 2. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2011.00002>.

Tomé, A. R., Castro, E., Santos, R. M., & Rosário, L. M. (2007). Selective stimulation of catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells by an ionotropic purinergic receptor sensitive to 2-methylthio ATP. BMC neuroscience, 8, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-41>.

- Tozzi, M., Larsen, A. T., Lange, S. C., Giannuzzo, A., Andersen, M. N., & Novak, I. (2018). The P2X7 receptor and pannexin-1 are involved in glucose-induced autocrine regulation in  $\beta$ -cells. *Scientific reports*, 8(1), 8926. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27281-9>.
- Ugur, M., & Ugur, Ö. (2019). A Mechanism-Based Approach to P2X7 Receptor Action. *Molecular pharmacology*, 95(4), 442–450. <https://doi.org/10.1124/mol.118.115022>.
- Varga, K. T., Jiang, Z., & Gong, L. W. (2014). Methods for cell-attached capacitance measurements in mouse adrenal chromaffin cell. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (92), e52024. <https://doi.org/10.3791/52024>.
- Vilhardt, H., & Hope, D. B. (1974). Adenosine triphosphatase activity in the neural lobe of the bovine pituitary gland. *The Biochemical journal*, 143(1), 181–190. <https://doi.org/10.1042/bj1430181>.
- Villanueva, J., Torregrosa-Hetland, C. J., García-Martínez, V., del Mar Francés, M., Viniegra, S., & Gutiérrez, L. M. (2012). The F-actin cortex in chromaffin granule dynamics and fusion: a minireview. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 48(2), 323–327. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9718-4>.

Waxham, M. Neal (2014). From Molecules to Networks || Neurotransmitter Receptors, 285–321. doi:10.1016/b978-0-12-397179-1.00010-5.

Weiss J. L. (2012). Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms in bovine adrenal chromaffin cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 740, 859–872. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\\_38](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_38).

Wong D. L. (2003). Why is the adrenal adrenergic?. *Endocrine pathology*, 14(1), 25–36. <https://doi.org/10.1385/ep:14:1:25>.

Yiangou, Y., Facer, P., Durrenberger, P., Chessell, I. P., Naylor, A., Bountra, C., Banati, R. R., & Anand, P. (2006). COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC neurology*, 6, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-6-12>.