

Bases fisiológicas para una interacción entre las células cromafines y las endoteliales de la glándula adrenal

Physiological bases for an interaction between chromaffin and endothelial cells from the adrenal gland

MARIO LUXORO¹ & RAUL VINET²

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Casilla 653, Santiago, Chile, e-mail: mluxoro@uchile.cl

² Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile, e-mail: raul.vinet@uv.cl

RESUMEN

En este trabajo tratamos de investigar las posibles interacciones entre las células endoteliales de la glándula adrenal y aquellas sustancias relacionadas con la secreción de las células cromafines. Para lo anterior, estudiamos el efecto de acetilcolina (ACh), o de catecolaminas (CA) tanto en el nivel de Ca^{2+} citoplasmático ($[Ca^{2+}]_i$), como en el potencial de membrana de las células endoteliales. Nuestros resultados muestran que tanto la ACh como la nicotina, pero no la muscarina, son capaces de inducir un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ y una despolarización de la membrana plasmática de las células endoteliales. El antagonista nicotínico, hexametonium, bloquea tanto el efecto de la ACh como de la nicotina lo que sugiere la presencia de receptores nicotínicos. Por otra parte, las CA (tanto adrenalina como noradrenalina o agonistas α_1 -adrenérgicos) también producen un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales aunque no despolarización evidente. En este caso, el aumento es bifásico siendo la primera fase de un pico rápido e independiente del Ca^{2+} extracelular en tanto que la segunda se presenta con oscilaciones y depende tanto de que los canales de Ca^{2+} no estén bloqueados como de la presencia de ese ión en el medio externo. Dado que se ha demostrado que el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales desencadena la secreción de sustancias vasodilatadoras (prostaciclina y óxido nítrico), proponemos que éste sería un mecanismo compensatorio del sistema para contrarrestar el enorme efecto vasoconstrictor de las CA secretadas por las células cromafines.

Palabras clave: endoteliales, cromafines, receptores, interacciones.

ABSTRACT

In this work we investigated the possible interactions between the endothelial cells from the adrenal gland and the substances related with the secretion from the chromaffin cells. In order to do so, we studied the effect of acetylcholine (ACh) or of catecholamines (CA) on the level of the membrane potential and the cytoplasmic concentration of free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in the endothelial cells. Our results show that ACh as well as nicotine, but not muscarine, are able to induce an increase in $[Ca^{2+}]_i$ and membrane depolarization of the endothelial cells. The nicotinic antagonist, hexamethonium, inhibits both the action of nicotine and of ACh, which suggests the presence of nicotinic receptors. On the other hand, CA (adrenaline as much as noradrenaline or α_1 -adrenergic agonists) also produce a rise in $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells but not a clear depolarization. In this case, the increase is biphasic, being the first phase a very rapid peak, independent of the external Ca^{2+} while the second phase shows oscillations and depends on the extracellular Ca^{2+} . This phase is diminished if the calcium channels are blocked. Since it has been demonstrated that an increment of $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells triggers the secretion of vasodilator substances such as prostacyclin and nitric oxide, we propose that this might be a compensatory mechanism in order to compensate the enormous vasoconstrictor effect that the secreted CA should have.

Key words: endothelial, chromaffin, receptors, interactions.

PRÓLOGO

Quien escribe estas líneas (M. L.), agradece muy sinceramente a la Sociedad de Genética por la invitación a escribir este trabajo en homenaje al Profesor Danko Brncic. En efecto, cuando Danko murió, M. L. estaba en el Hospital tratando de sobrevivir a una intervención cardíaca y vino a saber de la muerte de su apreciado maestro, colega y amigo sólo un mes después de su alta. Esta

oportunidad de escribir un trabajo en honor del Prof. Brncic, libera, en parte, a M. L. de la tremenda frustración de no haber estado con Danko en sus últimos días.

INTRODUCCIÓN

In vivo, la secreción de catecolaminas (CA) por la glándula adrenal es desencadenada por

estimulación de la médula suprarrenal mediante los nervios esplácnicos. Éstos, actúan sobre las células cromafines de la médula mediante la liberación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) el cual activa al receptor-canal, permitiendo la entrada a la célula de iones Na^+ y Ca^{2+} . Con lo anterior, la célula se despolariza y se activan los canales dependientes de voltaje, primero los de Na^+ y luego los de Ca^{2+} aumentando así la concentración intracelular de calcio libre, con lo que se desencadena el proceso de exocitosis (Ungar & Phillips 1983). Las CA así liberadas entran a la microcirculación de las adrenales y son distribuidas por el organismo animal. El proceso descrito, universalmente aceptado, tiene un contrasentido: Si en el proceso fisiológico se secreta una cantidad de CA que una vez distribuida por el organismo alcanzará una concentración desencadenante de vasoconstricción, esa misma cantidad de CA distribuidas en el volumen de la glándula adrenal, significará una concentración que podría llegar a ser tres órdenes de magnitud mayor, suponiendo que la razón volumen de animal / volumen de la glándula es a lo menos de 1000. En esas condiciones, la vasoconstricción en la glándula podría entorpecer muy severamente la distribución del material secretado.

Por otra parte, se ha establecido que las células endoteliales son capaces de producir sustancias vasoactivas, relajadoras de las fibras musculares lisas circundantes.

(Moncada et al. 1976, Furchgott & Zawadzki 1980, Palmer et al. 1987, Luckhoff et al. 1988, 1990, Watanabe et al. 1992). La señal intracelular para la liberación de tales sustancias vasoactivas es el aumento del calcio libre intracelular, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Himmel et al. 1993). En el contexto anterior, deberían considerarse los resultados de Bossu et al. (1989) y de Vinet & Vargas (1999) que señalan que las células endoteliales de glándula adrenal de mamífero, a diferencia de las endoteliales de otros tejidos, poseen canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. (Se ha descrito otra excepción en capilares de cerebro de rata (*Rattus norvegicus*, Berkenhout), pero en este caso, las endoteliales fueron obtenidas en condiciones especiales (Delpiano & Altura 1996). Se podría pensar, entonces, que de ser despolarizadas las endoteliales, se activarían esos canales y se aumentaría el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con lo que se liberarían sustancias vasoactivas.

Este trabajo tiene por objeto explorar la posibilidad de interacciones entre el proceso de secreción y el de distribución de CA por el organismo. Se estudiará la posibilidad que la ACh liberada por los nervios esplácnicos también pueda inducir cambios en las células endoteliales

(“interacción en paralelo”), dada la gran vecindad entre las células cromafines y las endoteliales (Coupland & Selby 1976). También se investigará la posibilidad que las CA liberadas tengan una acción en las endoteliales subyacentes. En ambos casos se indagará la posibilidad de que se induzcan despolarizaciones y, por lo tanto, aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

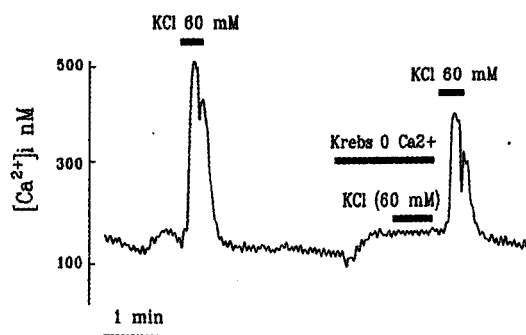


Fig. 1. Concentración de Ca^{2+} citosólico (nM) en función del tiempo (se repite en todos los gráficos que siguen excepto en el último). Inicialmente, la célula endotelial cargada con fluo-3, está inmersa en solución de Krebs y así será si no se indica otra cosa. Se observa el efecto de tres despolarizaciones con KCl (60 mM). La primera y la tercera en un Krebs en el cual 60 mM de NaCl fueron reemplazados por 60 mM de KCl. El Krebs 0 Ca^{2+} contiene 3,6 mM de MgCl_2 y no contiene CaCl_2 . La despolarización del centro fue hecha en un Krebs 0 Ca^{2+} en el cual 60 mM NaCl fueron reemplazados por 60 mM KCl. Las gruesas líneas negras horizontales indican los tiempos de tratamiento con las diversas soluciones (como en todos los gráficos que siguen). (Representativo de 6 experimentos).

Cytosolic Ca^{2+} concentration (nM) as a function of time (repeated in all the following figures except in the last one). Initially, the endothelial cell loaded with fura-3 is immersed in Krebs's solution. Three depolarizations with KCl (60 mM) are depicted. The first and the third one in Krebs in which 60 mM of NaCl were replaced by 60 mM KCl. Krebs 0 Ca^{2+} includes 3,6 mM of MgCl_2 and no CaCl_2 . The depolarization in the middle was effected in Krebs 0 Ca^{2+} in which 60 mM NaCl was replaced by 60 mM KCl. The thick black horizontal lines indicate the times of application of the different solutions (as in all the following figures). (Representative of 6 experiments).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de células

Se trabajó con células endoteliales cultivadas de adrenales de bovino (*Bos taurus*, Linnaeus) (CECAB), las cuales se elaboraron a partir de

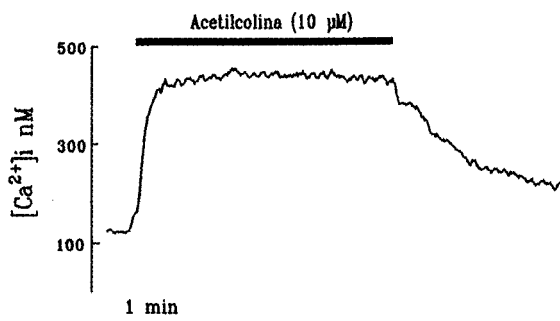


Fig. 2. Efecto de acetilcolina 10 μM . La droga se disolvi3 en soluci3n de Krebs como en todas las figuras que siguen. (Representativo de 8 experimentos).

Effect of 10 μM acetyl-choline. The drug was dissolved in Krebs's solution as in all following figures. (Representative of 8 experiments).

gl3ndulas lavadas y perfundidas a trav3s de la vena con soluci3n de Locke a la cual se agreg3 antibi3ticos (154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 5,0 mM NaHCO_3 , 5,6 mM glucosa, 5,0 mM Na-Hepes, 100 U/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomycin, 0,5 % alb3mina, pH 7,2). Luego se perfundieron con soluci3n Locke con 0,25 % de colagenasa y 0,01 % de inhibidor de tripsina y se incubaron posteriormente a 37 $^\circ\text{C}$ por 40 min. Las c3lulas as3 disociadas fueron suspendidas en Percoll y separadas por centrifugaci3n. Las c3lulas obtenidas fueron suspendidas en "Dulbecco's Modified Eagle's Medium" suplementado con 10 % suero fetal de vaca y cultivadas a 37 $^\circ\text{C}$ en una atm3sfera de aire con 5% de CO_2 y saturada de humedad. Los experimentos se hicieron con c3lulas cultivadas durante uno a tres d3as. Los detalles del m3todo est3n en otra publicaci3n (Vinet & Vargas 1999).

Identificaci3n de las CECAB

Las c3lulas endoteliales fueron identificadas por su morfolog3a y por captaci3n de LDL acetilada (Hoyer et al. 1973, Voyta et al. 1984).

Registro del potencial de membrana

Se utiliz3 la t3cnica de control de potencial de parche (patch clamp) (Hamill et al. 1981), en la configuraci3n "c3lula entera" ("whole cell"). Las micropipetas (3-6 $\text{M}\Omega$) fueron acercadas a la c3lula mediante un micromanipulador, hasta tocar levemente la superficie; en ese momento, mediante una leve succi3n, se logra establecer un

contacto entre la superficie seleccionada y el interior de la pipeta. Este contacto debe estar aislado del l3quido circundante por al menos una resistencia de 10 $\text{G}\Omega$, lo que se logra por la fuerte adhesi3n de la membrana celular al vidrio de la pipeta. Aplicando una succi3n adicional, se consigue romper el parche bajo la boca de la pipeta, de modo que 3sta queda en contacto directo con el interior de la c3lula. El potencial se midi3 en la modalidad de control de corriente a 0 μA ("current clamp").

Medici3n de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Para medir el Ca^{2+} citos3lico utilizamos el colorante fluorescente fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Las c3lulas fueron cargadas con la forma esterificada del fluo-3 (fluo-3 AM), lo que se consigui3 incub3ndolas por 20 a 30 min. en una soluci3n de Krebs (en mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2,6 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 2,5 NaHCO_3 , 10 glucosa, 5 Hepes-Na a pH 7,4) que conten3a fluo-3 AM (7 mM) y 3cido plur3nico (0,094 %). Al ingresar a la c3lula, el fluo-3 AM es hidrolizado por fosfatasas, consigui3ndose as3, que el colorante impermeable logre acumularse en el interior de la c3lula. Estas, lavadas con Krebs, se montaron en un microscopio donde fueron observadas individualmente. Fueron iluminadas con luz de 490 nm y se detect3 la luz emitida a 530 nm, para lo cual el microscopio contaba con los filtros adecuados. La luz emitida fue medida continuamente usando un fotomultiplicador Hamamatsu y

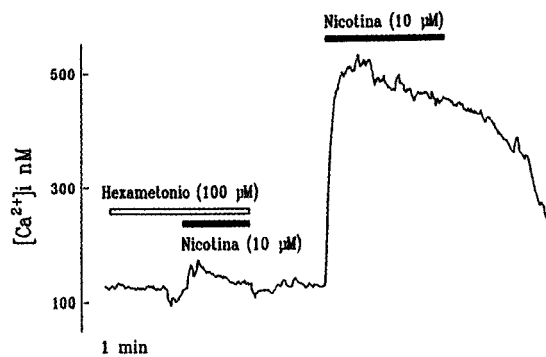


Fig. 3. La figura muestra la respuesta de la c3lula endotelial a nicotina 10 μM en presencia del inhibidor nicot3nico hexametonio (100 μM). Sigue un control en el cual s3lo se aplic3 nicotina. (Representativo de 6 experimentos).

This figure shows the response of the endothelial cell to 10 mM nicotine in the presence of the nicotinic inhibitor hexamethonium (100 μM). A control follows, in which only nicotine was applied. (Representative of 6 experiments).

digitalizada (3 Hz) empleando un conversor análogo-digital (Data Translation) instalado en un PC. La conversión de la señal fluorescente en $[Ca^{2+}]_i$ se realizó según Kao et al (1989), (Luxoro et al. 1997).

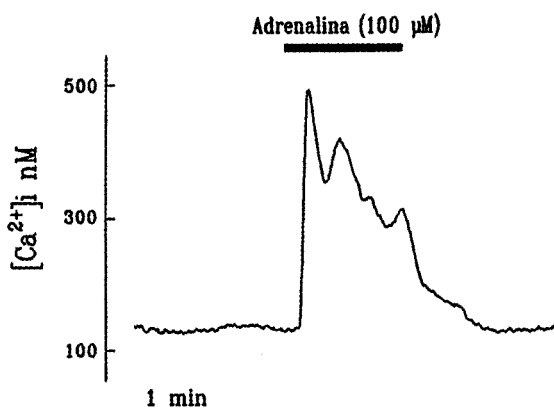


Fig. 4. Muestra el efecto de adrenalina 100 μ M en la célula endotelial. Aparecen dos fases de incremento del $[Ca^{2+}]_i$. La primera corresponde al primer pico y la segunda está formada por una serie de oscilaciones amortiguadas. Estas fases difieren con respecto a su dependencia del calcio extracelular. (Representativo de 8 experimentos).

The figure shows the effect of 100 μ M adrenaline in the endothelial cell. Two phases of the increment of $[Ca^{2+}]_i$ are depicted. The first phase corresponds to the first peak and the second to a series of damped oscillations. These phases differ with respect to their dependence on the extracellular calcium. (Representative of 8 experiments).

RESULTADOS

Despolarización con K^+

La Fig. 1 muestra el efecto de la despolarización con K^+ . Se observa un fuerte y rápido incremento del $[Ca^{2+}]_i$. La misma figura demuestra que este incremento proviene del Ca^{2+} exterior, ya que al suprimirlo, también se suprime el incremento del intracelular. Aparentemente, al activar por despolarización a los canales de Ca^{2+} , este ión penetra a la célula aumentando su concentración citoplasmática.

Receptores de ACh

La Fig. 2 demuestra que las endoteliales provenientes de la médula adrenal son sensibles a la ACh. Por acción de este agonista se genera un aumento marcado y prolongado del $[Ca^{2+}]_i$. Los receptores activados son de carácter nicotínico,

dado que la acción de la ACh es imitada por la nicotina y la acción de ésta es inhibida por hexametonio (Fig. 3). Hay que tener presente que al actuar la ACh se activan los canales del receptor (permeables a Na^+ y a Ca^{2+}) lo que conduce a despolarización y eventualmente activación de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje, los cuales, en células endoteliales, son inhibidos por Co^{2+} , Cd^{2+} y por dihidropiridinas (Vinet & Vargas 1999). El agonista colinérgico muscarina no fue capaz de inducir un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ (no se muestra).

Receptores adrenérgicos

El efecto de las catecolaminas sobre las endoteliales se muestra en la Fig. 4. La respuesta a 100 μ M adrenalina (o noradrenalina, no se muestra) consiste en un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ caracterizado por una primera fase rápida y una segunda más lenta y más o menos mantenida. Mientras que la primera fase se presenta en un solo pico, la segunda ocurre con oscilaciones relativamente amortiguadas. Experimentos no descritos en este trabajo (Vinet et al. 2000) señalan que la primera fase es independiente del Ca^{2+} extracelular en cambio la segunda fase lo es. En concordancia con lo anterior, la segunda fase es parcialmente bloqueada si se inhiben los canales de Ca^{2+} , en cambio la primera es severamente disminuida sólo si previamente se vacían los depósitos intracelulares de Ca^{2+} sensibles a cafeína (Vinet et al. 2000).

La Fig. 5 muestra que la fenilefrina, un agonista α_1 -adrenérgico, produce el mismo efecto que las catecolaminas. Esta figura también muestra que la fenoxibenzamina, conocido bloqueador α -adrenérgico inhibe la acción de la fenilefrina. La respuesta a fenilefrina, en cuanto a la forma y dependencia del Ca^{2+} extra o intracelular es igual aquella descrita para las CA (Vinet et al. 2000). Isoproterenol 10 mM (agonista β -adrenérgico) no produjo respuesta (no se incluye).

Potencial de membrana

Nicotina 10 μ M provocó una rápida despolarización del potencial de membrana que alcanzó un valor de $37,3 \pm 0,9$ mV ($n = 23$) sobre el potencial basal (Fig. 3). Lo anterior implica que la aplicación de nicotina 10 μ M a la célula endotelial en control de corriente (0 μ A), hace que el potencial de membrana cambie de un nivel de reposo de aproximadamente -50 mV a un estado de despolarización cercano a -10 mV. Idéntico resultado se obtuvo con 10 μ M de ACh con-

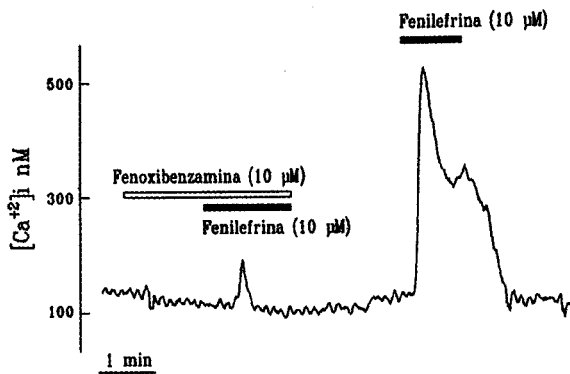


Fig. 5. Efecto del agonista α_1 -adrenérgico, fenilefrina $10 \mu\text{M}$ en presencia del bloqueador α -adrenérgico fenoxibenzamina ($10 \mu\text{M}$). Sigue un control en el cual se aplica sólo fenilefrina. La respuesta a esta última droga es similar a la que provoca la adrenalina. (Representativo de 6 experimentos).

Effect of the agonist α_1 -adrenergic phenylephrine ($10 \mu\text{M}$) in the presence of the α -adrenergic blocker phenoxibenzamine ($10 \mu\text{M}$). A control follows in which only phenylephrine is applied. The response to the last drug is similar to that provoked by adrenaline. (Representative of 6 experiments).

firmando la naturaleza nicotínica de los receptores implicados (no se muestra). Por otra parte, los datos que tenemos respecto a la acción de CA en el potencial de membrana de las células endoteliales no son concluyentes. Pareciera que induciría una pequeña despolarización que se pierde dentro de las variaciones estadísticas naturales del sistema. Aumentando el número de observaciones podremos, tal vez, en el futuro dilucidar este punto.

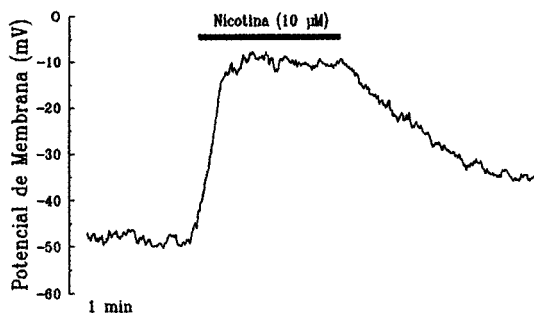


Fig. 6. Potencial de membrana (en mV) de la célula endotelial en función del tiempo. Se muestra la despolarización inducida por nicotina ($10 \mu\text{M}$). (Representativo de 6 experimentos).

Membrane potential (in mV) of the endothelial cell as a function of time. The depolarization induced by $10 \mu\text{M}$ nicotine is depicted. (Representative of 23 experiments).

DISCUSI3N

En el presente trabajo se ha establecido que tanto la estimulación colinérgica como la α_1 -adrenérgica producen un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las células endoteliales de la médula adrenal. Lo anterior nos sugiere dos tareas importantes: a) Una explicación del fenómeno, y b) una discusión respecto de su posible importancia fisiológica.

Si consideramos al efecto de la ACh, podemos proponer un mecanismo razonable y fundamentado: La ACh tiene en las células endoteliales un efecto nicotínico; vale decir, actúa sobre el receptor-ionóforo correspondiente, activando un canal permeable tanto al Na^+ como al Ca^{2+} con lo cual estos iones penetran a la célula produciendo, como en las cromafines, una despolarización suficiente para activar a su vez a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con lo cual se refuerza la entrada de este ión. En estos experimentos hemos mostrado tanto la acción nicotínica de la ACh, como su efecto despolarizante en la membrana de las células endoteliales. Si a lo anterior se añade la descripción de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje hecha recientemente en endoteliales de médula suprarrenal por Vinet & Vargas (1999), se desprende la coherencia de la interpretación sugerida.

Respecto al mecanismo desencadenado por las CA es evidente que hay en juego a lo menos dos. El primer pico de aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debe ser efecto de un segundo mensajero, dado que depende de depósitos intracelulares y no del Ca^{2+} externo. La segunda fase de aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ depende parcialmente tanto del Ca^{2+} externo como de la actividad de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. En contradicción con lo anterior, está el hecho que las CA despolarizan muy poco a las endoteliales. Una posible explicación de la contradicción señalada podría ser que los canales de Ca^{2+} tipo T descritos por Vinet & Vargas (1999) tienen un umbral muy bajo y podrían ser estimulados por muy pequeñas despolarizaciones. Sin embargo, el efecto es sólo parcialmente dependiente del Ca^{2+} externo, por lo que también podría estar en juego la acción de un segundo mensajero. Obviamente, la dilucidación de este mecanismo deberá ser tarea de otro trabajo.

En relación con la significación fisiológica del aumento del Ca^{2+} citoplasmático producido tanto por ACh como por CA, creemos que debe ser interpretado a la luz de experimentos que demuestran que este aumento provoca la secreción, por parte de las células endoteliales, de sustancias vasodilatadoras como prostaciclina y óxido nítrico (Moncada et al. 1976, Furchgott et al. 1980, Palmer et al. 1987, Luckhoff et al. 1988,

1990, Watanabe et al. 1992). Nuestra hipótesis, por lo tanto, es que la estimulación de las células cromafines de las adrenales mediante ACh, al mismo tiempo que provoca la secreción de CA, también determina (por acción de la misma ACh y de las CA secretadas) una condición de vasodilatación que se opondría al fuerte efecto (directo sobre la musculatura lisa vascular) vasoconstrictor de las CA. En conexión con lo anterior, se ha informado que otro elemento cosecretado con las CA por las células cromafines, el ATP (adenosín trifosfato) (Rojas et al. 1985), tiene también la propiedad de elevar el $[Ca^{2+}]_i$ (Castro et al. 1994) y la formación de prostaciclina en las células endoteliales de la glándula adrenal (Forsberg et al. 1987). Pareciera que toda la secreción de las células cromafines conlleva, en último término, la propiedad de inducir vasodilatación. Es conveniente enfatizar que los datos presentados y discutidos en este trabajo demuestran sólo la existencia de propiedades de la secreción de las células cromafines y de las células endoteliales que podrían permitir su interacción. Creemos que el problema de demostrar que realmente se produce interacciones entre las células puede ser abordado con cocultivo de ambas células. La idea sería despolarizar una cromafina (mediante la técnica de control de potencial, "patch clamp, whole cell") y registro simultáneo del $[Ca^{2+}]_i$ de la célula endotelial adyacente. Mediante otras técnicas, Vargas et al. (1998) lograron evidencias de interacciones entre ambas células. Lamentablemente, estos experimentos, aunque muy ingeniosos, estaban basados en la suposición que las endoteliales, en las condiciones experimentales, carecían de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que no se constató en las endoteliales usadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto Fondecyt 1960302. Quisiéramos agradecer a la Dra. Maritza Rebolledo por proveernos las glándulas adrenales y al Dr. Alberto Veloso quien tuvo la gentileza de ayudarnos en una sección de la redacción de este trabajo.

LITERATURA CITADA

- BOSSU JL, A FELTZ, JL RODEAU & F TANZI (1989) Voltage-dependent transient calcium currents in freshly dissociated capillary endothelial cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 255: 377-380.
- CASTRO E, AR TOME, MT MIRAS-PORTUGAL, LM ROSARIO (1994) Single-cell fura-2 microfluorometry reveals different purinoceptor subtypes coupled to Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release in bovine adrenal chromaffin and endothelial cells. *Pflügers Archiv* 426: 524-533.
- COUPLAND RE & JE SELBY (1976) The blood supply of the mammalian adrenal medulla: a comparative study. *Journal of Anatomy* 122: 539-551.
- DELPIANO M & B ALTURA (1996) Modulatory effect of extracellular Mg^{2+} ions on K^+ and Ca^{2+} currents of capillary endothelial cell from rat brain. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 394: 335-339.
- FORSBERG EJ, G FEUERSTEIN, E SHOHAMI & HB POLLARD (1987) Adenosine triphosphate stimulates inositol phospholipid metabolism and prostacyclin formation in adrenal medullar endothelial cells by means of P_2 -purinergic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 5630-5634.
- FURCHGOTT RF & JV ZAWADZKI (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- HIMMEL H, R WHORTON & H STRAUSS (1993) Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 21: 112-127, 1993.
- KAO JP, AT HAROOTUNIAN & RY TSIEN (1989) Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3. *Journal of Biological Chemistry* 264: 8171-8178.
- LUCKHOFF A & R BUSSE (1990) Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflügers Archiv* 416: 305-311.
- LUCKHOFF A, U POHL, A MULSCH & R BUSSE (1988) Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 95: 189-196.
- LUXORO M, V NASSAR-GENTINA & E ROJAS (1997) Deprivation of Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} from the extracellular solution increases cytosolic Ca^{2+} and stimulates catecholamines secretion from cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 170: 65-74.
- MONCADA S, R GRYGLEWSKY, S BUNTING & JR VANE (1987) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665.
- PALMER RM, AG FERRIDGE & S MONCADA (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
- ROJAS E, HB POLLARD & E HELDMAN (1985) Real-time measurements of acetylcholine-induced release of ATP from bovine medullary chromaffin cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 185: 323-327.
- UNGAR A & JH PHILLIPS (1983) Regulation of the adrenal medulla. *Physiological Reviews* 63: 787-843.

- VARGAS F, S CALVO, R VINET & E ROJAS (1998) Interactions between bovine adrenal medulla endothelial and chromaffin cells. En: Bassingthwaighe, Goresky & Linehan (eds) Whole organ approaches to cellular metabolism: 91-105. Springer, Berlin, Germany.
- VINET R, F ROJAS, M LUXORO, F VARGAS & M CORTES (2000) Catecholamines-evoked cytosolic Ca²⁺ rise in endothelial cells from bovine adrenal medulla. *Molecular and Cellular Biochemistry* 203: 53-58.
- VINET R & F VARGAS (1999) Separate L and T voltage-gated Ca²⁺ currents in adrenal medulla endothelial cells: gating and pharmacological characteristics. *American Journal of Physiology* 276: H1313-H1322.
- VOYTA JC, DP VIA, CE BUTTERFIELD & BR ZETTER (1984) Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *Journal of Cell Biology* 99: 2034-2040.
- WATANABE K, G LAN & EA JAFFE (1992) The correlation between rises in intracellular calcium and PGI₂ production in cultured vascular endothelial cells. *Prostaglandins* 46: 211-214.

Editores Invitados: R. Godoy-Herrera y G. Gajardo

Recibido el 15 de abril de 2000; aceptado el 18 de septiembre de 2000