



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LAS POZAS INTRACELULARES DE Ca^{2+} EN LA HIPERSECRECCIÓN DE
CATECOLAMINAS EN LAS CÉLULAS CROMAFINES ADRENALES EN EL MODELO DE LA
RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA**

TESIS

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

PRESENTA:

PATRICIA ELIZABETH LÓPEZ BISTRAIN

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

COMITÉ TUTOR:
DR. FREDY ROBERTO CIFUENTES NAVARRO
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)
DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ
(FACULTAD DE MEDICINA)

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LAS POZAS INTRACELULARES DE Ca^{2+} EN LA HIPERSECRECCIÓN DE
CATECOLAMINAS EN LAS CÉLULAS CROMAFINES ADRENALES EN EL MODELO DE LA
RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA**

TESIS

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

PRESENTA:

PATRICIA ELIZABETH LÓPEZ BISTRAIN

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

COMITÉ TUTOR:
DR. FREDY ROBERTO CIFUENTES NAVARRO
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)
DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ
(FACULTAD DE MEDICINA)

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2013.

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología y Biomedicina en su sesión ordinaria, celebrada el día 9 de septiembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS de la alumna, LÓPEZ BISTRAN PATRICIA ELIZABETH con número de cuenta 51102112-5 con la tesis "Participación de las pozas intracelulares de Ca²⁺ en la hipersecreción de catecolaminas en las células cromafines adrenales en el modelo de la rata espontáneamente hipertensa", realizada bajo la dirección del DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ.

Presidente: DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ
Vocal: DRA. CITLALI TRUETA SEGOVIA
Secretario: DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDÁRIZ
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA
Suplente: DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de octubre de 2013.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

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

Gracias al apoyo otorgado por:

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

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto, teniendo el número de CVU 385012 y número de becario 255119 a partir de la fecha 31 de enero del 2011 hasta el 30 de enero del 2013.

El apoyo de los proyectos PICSA10-116 (ICyTDF), CONACyT 79763 y DGAPA-PAPIIT IN222413.

Los miembros del Comité Tutor por dar seguimiento a mi formación académica, además por sus valiosas observaciones y sugerencias a este trabajo:

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

Dr. Dr. Fredy Roberto Cifuentes Navarro (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz (Facultad de Medicina, UNAM).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Arturo Hernández Cruz por aceptar ser mi Tutor Principal y darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en su laboratorio. Además por sus apreciados aportes y observaciones los cuales hicieron posible concluir exitosamente este proyecto.

Al Dr. Pedro Segura Chama por instruirme en la técnica utilizada en este trabajo, así como por su invaluable guía, críticas, sugerencias, paciente seguimiento y por compartir su tiempo de manera generosa durante el desarrollo de este trabajo.

A la Biól. Diana Millán Aldaco por su asistencia siempre profesional en la elaboración de los cultivos primarios y por proporcionarnos varios de éstos en los momentos críticos de este estudio.

A la Dra. Claudia Rivera Cerecedo por su constante espíritu servicial en cuidar, mantener y proporcionarnos las ratas SHR y WKY.

Al Dr. Nicolás Jiménez Pérez por su asistencia y apoyo técnico brindado dentro del laboratorio.

Al Dr. Luis Miguel Gutiérrez Pérez por su contribución en la implementación de la técnica de amperometría en nuestro laboratorio.

A los revisores de esta tesis y miembros del Jurado: Dr. David García, Dra. Citlali Trueta, Dra. Martha Pérez, Dr. Miguel Morales y Dra. Marcia Hiriart por sus valiosas sugerencias y críticas constructivas a la versión original del manuscrito que contribuyeron al mejorar y ordenar el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Luisa Durán, Biól. Tzitzitlini Alejandre, Biól. Daniel Bahena, Dra. Deisy Gasca, Dra. Claudia Sánchez, Biól. Andrea Pantoja y QFB Johanna Peña.

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

Agradezco y dedico este trabajo con mucho amor y cariño,

A mis padres Patricia y Javier

A mi hermana Marycarmen

A mi abuela Chayo

A Leopoldo

A mis queridos amigos

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS
RESUMEN
ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	Pág.
	1. El Sistema Simpadrenal	1
	1.1 La Respuesta al estrés	1
	1.2 Sistema Simpatoadrenal y la Presión Arterial	2
	1.3 La Hipertensión Arterial Esencial	3
	2. Las Ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR) y Wistar Kyoto (WKY)	5
	2.1 Modelo Animal de la Hipertensión Arterial Esencial	5
	2.2 Característica de las Ratas SHR	6
	2.3 Las Ratas WKY como Control Normotenso	7
	3. Generalidades de las Glándulas Adrenales	8
	3.1 Anatomía y Función de las Glándulas Adrenales	8
	3.2 La Médula Adrenal	8
	4. Generalidades de las Catecolaminas (CA)	10
	4.1 Síntesis y Degradación de las Catecolaminas	10
	4.2 Efectos Biológicos de las Catecolaminas	11
	4.3 Las Catecolaminas se encuentran almacenadas en las Vesículas Cromafines	12
	5. Secreción de Catecolaminas por las Células Cromafines Adrenales	13
	5.1 Estimulación de la Secreción	13
	5.2 El Potencial de Acción	14
	5.3 La Exocitosis de las Vesículas Cromafines	16
	6. Las Señales de Ca ²⁺ en las Células Cromafines Adrenales	18
	6.1 Las Pozas Intracelulares de Ca ²⁺ . Importancia del Retículo Endoplásmico	19
	6.2 Liberación de Calcio inducida por Ca ²⁺ (CICR) en las Células Cromafines Adrenales	20
II.	ANTECEDENTES	22
III.	JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	29
IV.	HIPÓTESIS	30
V.	OBJETIVOS	
	1. Objetivo General	30
	2. Objetivos Particulares	30
VI.	METODOLOGÍA	
	1. Modelo Animal (Ratas SHR y WKY)	31
	1.1 Monitoreo de la presión arterial en las Ratas SHR y WKY	31
	2. Preparación de Cultivo de las Células Cromafines Adrenales	32
	2.1 Obtención de Cultivo Celular	32

3.	Registros Electrofisiológicos	34
3.1	Técnica de Amperometría	35
3.2	Elaboración de Microelectrodos de Fibra de Carbono	36
3.3	Registros Amperométricos	38
3.4	Análisis de las Espigas Amperométricas	40
3.5	Análisis Estadísticos	
VII.	RESULTADOS	
1.	Valores de la Presión Arterial y Frecuencia Cardíaca en las Ratas SHR y WKY	41
2.	Liberación Espontánea de CA en las CCs Adrenales de las Ratas SHR y WKY	41
3.	Liberación de CA tras una Despolarización con Alto K ⁺ en las CCs Adrenales de las Ratas SHR y WKY	45
4.	Liberación de Ca inducida por el Vaciamiento de las Pozas Intracelulares de Ca ²⁺ del RE por Cafeína en las CCs Adrenales de las Ratas SHR y WKY	49
5.	La Salida de Ca ²⁺ del RE favorece la Liberación de Vesículas de Secreción con mayor contenido de CA en las CCs Adrenales de las Ratas SHR y WKY	53
6.	Efecto del Bloqueo Específico de la Salida de Ca ²⁺ del RE a través de los Receptores de Rianodina sobre la Liberación de CA en las CCs Adrenales de las Ratas SHR y WKY	56
VIII.	DISCUSIÓN	
1.	Las CCs Adrenales de las Ratas SHR presentan una mayor Actividad de Liberación Espontánea de CA en comparación con las CCs Adrenales de las Ratas WKY	63
2.	La Liberación de CA inducida por una Despolarización con Alto K ⁺ es mayor en las CCs Adrenales de las Ratas SHR.	65
3.	La Liberación del Ca ²⁺ del RE por Cafeína genera una mayor secreción de CA en las CCs Adrenales de las Ratas SHR.	66
4.	La salida de Ca ²⁺ del RE promueve de manera más eficaz el reclutamiento de Vesículas con mayor contenido de CA en comparación con una Despolarización con Alto K ⁺ .	68
5.	El Bloqueo específico de la salida de Ca ²⁺ del RE a través de los receptores de Ry disminuye la liberación de CA en las CCs adrenales de las ratas SHR	68
IX.	CONCLUSIONES	71
X.	BIBLIOGRAFÍA	74

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _{ER}	Concentración de Ca ²⁺ en el retículo endoplásmico
[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de Ca ²⁺
ACh	Acetilcolina
ATP	Adenosina de trifosfato
CA	Catecolaminas
CCDV	Canales de Calcio dependientes de Voltaje
CCs	Células cromafines
CICR	<i>Calcium-induced-Ca²⁺ release</i> , Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺
COMT	Catecol O-metil transferasa
DAG	Diacilglicerol
DBH	Dopamina -hidroxilasa
ICa ²⁺	Corriente de Ca ²⁺
IP ₃	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
IP ₃ R	Receptores de IP ₃
LDCV	<i>Large dense-core vesicles</i> , Vesículas grandes de núcleo denso
mAChR	Receptores muscarínicos
MAO	Oxidasa de monoaminas
nAChR	Receptores nicotínicos
pA	picoamperios
pC	picocoulomb
PLC	Fosfolipasa C
PNMT	<i>Phenylethanolamine N-methyltransferase</i> , Feniletanolamina N-metiltransferasa
RE	Retículo endoplásmico
Ry	Rianodina
RyR	Receptores de Rianodina
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i> , Ratas espontáneamente hipertensas
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i> , Receptor del factor de anclaje de la proteína de fijación sensible a N-etilmaleimida soluble.
SNP	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Simpático
TH	Hidroxilasa de tirosina
WKY	<i>Wistar Kyoto Rats</i> , Ratas Wistar Kioto

RESUMEN

Las alteraciones en la actividad del sistema simpatoadrenal y el incremento de los niveles séricos de catecolaminas pueden estar implicadas en la patogénesis de la hipertensión arterial esencial tanto en los pacientes hipertensos como en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Se ha planteado que la hipersecreción de CA en las células cromafines adrenales en las ratas SHR pueden ser el resultado de: a) una mayor entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje y/o b) una mayor liberación de Ca^{2+} hacia al citosol proveniente de las pozas intracelulares. Estudios de nuestro laboratorio demostraron que no existen diferencias en la corriente entrante de Ca^{2+} en las células cromafines de ratas SHR en comparación con las células cromafines de las ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY). Por lo tanto, es posible que un incremento en la movilización de Ca^{2+} intracelular y la amplificación de la señal de Ca^{2+} por la Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, por sus siglas en inglés) en el retículo endoplásmico puedan estar implicados en la hipersecreción de CA en las células cromafines de las ratas SHR durante la etapa inicial de la hipertensión esencial.

Los objetivos de este estudio son 1) comparar la liberación de CA tanto basal como estimulada en las células cromafines de las ratas SHR y WKY durante la etapa inicial de la hipertensión esencial y 2) examinar si una mayor contribución en la salida del Ca^{2+} de las pozas intracelulares puede ser la causa de la hipersecreción de catecolaminas en las células cromafines de las ratas SHR.

Para este estudio se utilizaron células cromafines adrenales provenientes de ratas macho de la cepa WKY y SHR de 7-12 semanas de edad. Previamente se verificaron los valores de presión arterial, resultando ser mayores en las ratas SHR en comparación con las ratas WKY (sistólica: 147.1 vs. 111.2 mmHg; diastólica: 108.7 vs. 81.4 mmHg, $p < 0.05$ respectivamente). Para los registros amperométricos se utilizaron células en cultivo primario donde un electrodo de fibra de carbono a un voltaje fijo de +700 mV fue colocado haciendo estrecho contacto con la célula cromafín a examinar. Las espigas amperométricas registradas durante la actividad espontánea y tras la aplicación de un pulso con K^+ (60 mM, durante 5 s) ó Cafeína (10 mM; durante 10 s) fueron evaluadas y analizadas. Además, las espigas generadas tras un pulso con alto K^+ fueron comparadas antes y después una incubación con Rianodina (10 μM , durante 10 min) con el fin de bloquear la salida de Ca^{2+} de los receptores de Rianodina y la amplificación por CICR en las células cromafines para ambas cepas.

Los resultados obtenidos muestran que existe un mayor porcentaje de células cromafines en las ratas SHR (94%) que presentaron una liberación espontánea de catecolaminas en comparación con las ratas WKY (77%). Tras la aplicación de un pulso de alto K^+ o Cafeína se observó un incremento en la frecuencia de las espigas amperométricas obtenidas, las cuales fueron de mayor amplitud y carga promedio en las células cromafines de las ratas SHR en comparación con las ratas WKY para ambos tratamientos. La carga acumulada obtenida después de un pulso con alto K^+ ó un pulso con Cafeína fueron ~2 veces mayores en las células cromafines de las ratas SHR vs. WKY. Después de la incubación con Rianodina, en las células cromafines de las ratas WKY, las espigas amperométricas generadas tras un pulso con alto K^+ fueron de mayor amplitud promedio, no así para la frecuencia, carga promedio y la carga acumulada las cuales fueron similares antes y después de la incubación con Rianodina. En las células cromafines de las ratas SHR, las espigas amperométricas generadas tras un pulso con alto K^+ después de la incubación con Ry disminuyeron en número, frecuencia, amplitud y carga promedio. La carga acumulada fue ~4 veces menor después de la incubación con Ry en comparación a lo obtenido antes de la incubación con Rianodina.

Nuestros resultados muestran que existe una mayor liberación de catecolaminas de forma basal como estimulada en las células cromafines de las ratas SHR durante la etapa inicial de la hipertensión, la cual puede deberse a una mayor contribución del Ca^{2+} proveniente de las pozas intracelulares del retículo endoplásmico vía CICR. Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que alteraciones en las células cromafines de la médula adrenal puedan estar involucradas en la fisiopatología de la hipertensión esencial en las ratas SHR. Nuestros hallazgos contribuyen a la identificación de nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos antihipertensivos que puedan actuar sobre la maquinaria de excitación.

ABSTRACT

Alteration of the activity of the sympathoadrenal medullary system and an augmented catecholamine serum levels have been implicated in the pathogenesis of essential hypertension in hypertensive patients and in the animal model for essential hypertension (Spontaneously Hypertensive Rats, SHR). The enhancement of catecholamine release in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats (SHR) could result from a) an increased Ca^{2+} entry through voltage-gated Ca^{2+} channels and/or b) enhanced of Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores. The first possibility alone is unlikely, since we have previously reported that Ca^{2+} currents of CCs from SHR and normotensive Wistar Kyoto rats (WKY) are quite similar. Thus, an augmented intracellular Ca^{2+} release and higher gain of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) from the endoplasmatic reticulum in SHR chromaffin cells during the initial phase of arterial hipertension is more likely.

The aim of this study is 1) to compare basal and stimulated CA secretion in adrenal chromaffin cells from SHR and WKY during the initial phase of essential hypertension and 2) to test the hypothesis that intracellular Ca^{2+} release from intracellular stores contributes in greater proportion to CA hypersecretion in SHR chromaffin cells.

Adrenal chromaffin cells were obtained from SHR and WKY male rats (7-12 weeks old). Blood pressure was higher in SHR compared to WKY rats (systolic: 147.1 vs. 111.2 mmHg; diastolic: 108.7 vs. 81.4 mmHg, respectively $p < 0.05$). For amperometric recordings, chromaffin cells primary culture was used. A carbon fiber electrode was kept at +700 mV and placed making a tight contact with the chromffin cell surface for testing. Amperometric spikes occurring spontaneously and after application of high K^+ (60 mM; 5 s) or Caffeine (10 mM; 10 s) were evaluated. Additionally, spikes elicited by high K^+ application were examined before and after incubation with Ryanodine (10 μM ; 10 min) to blocked Ryanodine receptors and weaken CICR.

Our results showed that 94% of SHR chromaffin cells showed low-frequency spontaneous catecholamine release events in comparison with 77% of WKY. High K^+ or Caffeine application elicited bursts of amperometric spikes which were larger in frequency, amplitude and mean charge per spike in SHR compared to WKY chromaffin cells. Cumulative secretion after a pulse of high K^+ or Caffeine was ~2-fold higher in SHR compared to WKY chromaffin cells. After incubation with Ry, high K^+ -elicited spikes increased their amplitude but not their frequency, mean spike charge and cumulative secretion in WKY chromaffin cells before and after Ry. Interestingly, in SHR CCs, high K^+ -elicited amperometric spikes after Ry treatment were smaller in amplitude and mean spike charge. Spike frequency and spike number were also significantly reduced. Consequently, cumulative secretion values were significantly reduced (~4-fold) after Ry incubation.

The detail comparison of spontaneous and stimulated catecholamine secretory events in SHR and WKY chromaffin cells strongly suggests a greater contribution of intracellular Ca^{2+} release from endoplasmatic reticulum via CICR in SHR compared to WKY chromaffin cells. We believe that these data supports the hypothesis that chromaffin cells from the adrenal medullae are involved in the pathogenesis of hypertension in SHR rats. In addition, our results provide clues to identify new targets for the development of novel antihypertensive compounds acting on the exocytotic machinery.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA SIMPATOADRENAL

1.1 LA RESPUESTA AL ESTRÉS

El sistema nervioso central (SNC) dirige la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA) por medio de zonas ubicadas en corteza cerebral, el hipotálamo y en el tallo cerebral (Guyton & Hall, 2006a; De Diego *et al.*, 2008). Las vías autónomas están formadas por las neuronas eferentes que abandonan el SNC y por las neuronas aferentes que transmiten información desde la periferia al SNC. La vía aferente se encarga de transmitir la sensación visceral y de la regulación de los reflejos vasomotores y respiratorios (Guyton & Hall, 2006).

El control y las respuestas ejercidas por el SNA se llevan a cabo mediante sus dos subsistemas: el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNP). Un incremento en la actividad del SNS ocurre bajo condiciones de estrés, ansiedad, actividad física, miedo o excitación; mientras que un incremento en actividad del SNP ocurre durante un estado sedentario, la alimentación y diversas funciones “vegetativas” del organismo (Boron & Boulpaep, 2008a).

La respuesta del organismo ante una situación de amenaza o estrés constituye un claro ejemplo de la integración neuroendocrina, ya que involucra una serie de reacciones en cadena que preparan al organismo para la respuesta de pelea o huida (Boron & Boulpaep, 2008). Bajo una situación de estrés física y/o psicológica se activan las neuronas del tallo cerebral o las áreas del sistema límbico lo que produce una activación coordinada del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en donde, por un lado, se promueve la producción y secreción de corticoesteroides (cortisol) por la corteza adrenal, y por otro lado, la biosíntesis y liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) por las células cromafines (CCs) en la médula adrenal mediante el control de la actividad nerviosa simpática (Boron & Boulpaep, 2008a). Al complejo anatómico-funcional conformado por el SNS y la médula adrenal se le ha denominado sistema simpatoadrenal (Landsberg & Young, 1992).

La importancia del sistema simpatoadrenal ante un evento estresante radica en la liberación masiva al torrente sanguíneo de adrenalina y noradrenalina, hormonas que prepara al organismo para encarar la respuesta de “pelea o huida” (Cannon, 1929). La adrenalina y noradrenalina actúan en distintos órganos (Hoffman & Taylor, 2001) (Sección 4.2). La respuesta ante el estrés es rápida, altamente coordinada y precisa dirigida a mantener el equilibrio del medio interno siendo una

respuesta adaptativa para la supervivencia del organismo (Cannon, 1929; De Diego *et al.*, 2008). Al efecto provocado por la adrenalina y noradrenalina (catecolaminas secretadas por la médula adrenal) se le suma la acción de los corticoesteroides producidos en la corteza adrenal. Por lo tanto, la acción combinada de la corteza adrenal y el sistema simpatoadrenal permiten la activación de varios aparatos para proveer las demandas inmediatas de energía requeridas para responder al estímulo agresor o de estrés (Boron & Boulpaep, 2008a).

1.2 EL SISTEMA SIMPATOADRENAL Y LA PRESIÓN ARTERIAL

En la regulación de la circulación sanguínea y de la presión arterial participan de forma sinérgica el SNS y la médula adrenal (Landsberg & Young, 1992; Dampney *et al.*, 2002). La presión arterial está determinada por dos factores: la propulsión de la sangre por el corazón (gasto cardíaco) y la resistencia de su flujo a través de los vasos sanguíneos (resistencia total periférica). La estimulación nerviosa simpática y la acción de adrenalina y/o noradrenalina circulantes en la sangre aumentan la propulsión cardíaca y la resistencia al flujo, lo que suele ocasionar un ascenso brusco de la presión arterial (Guyton & Hall, 2006b).

La tasa promedio de secreción de adrenalina por la médula adrenal humana en reposo es $0.2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ y de noradrenalina de $0.05 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Estos valores dan como resultado niveles de catecolaminas (CA) en el torrente sanguíneo (97 pg mL^{-1} de adrenalina y 253 pg mL^{-1} de noradrenalina) suficientes para mantener la presión arterial en rangos normales en condiciones basales, incluso si se eliminan todas las vías simpáticas que inervan directamente al aparato cardiovascular (De Diego *et al.*, 2008; Guyton & Hall, 2006b). Por lo tanto, gran parte del tono global es consecuencia de la secreción basal de adrenalina y noradrenalina por la médula adrenal, además del tono que resulta de la estimulación simpática directa.

Cuando se estimula al SNS durante el estrés, las terminaciones nerviosas simpáticas posganglionares liberan noradrenalina que excita principalmente al corazón y contrae los vasos sanguíneos. Además, los nervios simpáticos preganglionares que inervan a la médula adrenal provocan la secreción de adrenalina y noradrenalina a la circulación sanguínea consiguiéndose un sistema de control doble: 1) una estimulación nerviosa directa y 2) los efectos indirectos de la adrenalina y noradrenalina circulantes en la sangre (Guyton & Hall, 2006b, De Diego *et al.*, 2008). Por lo tanto, tanto el SNS y de la médula adrenal se potencian entre sí. Por lo general, la noradrenalina liberada de las terminaciones posganglionares simpáticas directamente a un tejido permanece activa durante unos pocos segundos, ya que la recaptación y difusión de la noradrenalina ocurre rápidamente en la hendidura sináptica. Sin embargo, la adrenalina y

noradrenalina secretadas por la médula adrenal a circulación sanguínea permanecen activas hasta que se difunden a algún tejido, donde son degradadas (Sección 4.1). Por lo tanto, cuando se secretan a la sangre, la adrenalina y la noradrenalina permanecen muy activas durante 10 a 30 segundos y después su actividad declina, debilitándose durante uno o varios minutos. (Guyton & Hall, 2006b, De Diego *et al.*, 2008).

Gran parte de la importancia del sistema simpatoadrenal radica en la respuesta aguda a diferentes estímulos estresantes; sin embargo, es muy probable que ante el estrés crónico también tenga gran relevancia. Se desconoce si el incremento sostenido en la actividad simpatoadrenal pueda generar alteraciones que promuevan la aparición de la hipertensión arterial (Sección 1.3). Existen reportes donde se han relacionado distintas alteraciones en el sistema simpatoadrenal con el origen de la hipertensión arterial (Anderson *et al.*, 1989; Goldstein *et al.*, 1983; Goldstein, 1993; Korner *et al.*, 1993; Currie *et al.*, 2012).

1.3 LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL

La presión arterial se define como la presión hidrostática generada en el sistema arterial por el bombeo de la sangre del corazón contra la resistencia periférica de los vasos sanguíneos. Los parámetros de interés son la presión máxima o *sistólica*, referida como la presión generada durante la contracción del corazón; la mínima o *diastólica*, que ocurre justo antes de la siguiente contracción (Guyton & Hall, 2006b). Los valores normales de presión arterial son ~120/80 milímetros de mercurio (mm Hg) sistólica/diastólica respectivamente. Las variaciones por debajo de los valores normales ($\leq 90/50$ mm Hg) se consideran como hipotensión, mientras que valores por arriba de los niveles normales ($\geq 140/90$ mm Hg) se consideran como hipertensión. La etapa inicial de la hipertensión arterial donde los valores oscilan entre 140-159 / 90-99 mm Hg se clasifica como hipertensión fase 1, mientras que un agravamiento de la hipertensión arterial donde los valores son 160 / 100 mm Hg se clasifica como fase 2 (Perloff *et al.*, 1989; Guyton & Hall, 2006b; Vikrant & Tiwari, 2001).

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica con una alta prevalencia alrededor del mundo y nuestro país no escapa a esta realidad. En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 señala que un 31.5% de la población adulta mayor de 20 años de edad presenta hipertensión arterial (Campos-Nonato *et al.*, 2013).

La hipertensión arterial donde la causa es desconocida se denomina y clasifica como *hipertensión arterial esencial*. A aquella hipertensión que tiene una causa demostrable, se le ha

denominado *hipertensión arterial secundaria* la cual está asociada al desarrollo y presencia de patologías como: glomerulonefritis crónica, estenosis de la arteria renal, hipercorticismo, feocromocitoma, aldosteronismo primario y pre-clampsia. (Stokes *et al.*, 1987). Aproximadamente 90% de los pacientes con presión arterial elevada se diagnostican como hipertensión arterial esencial; mientras que en el 10% restante corresponden al tipo secundario (Fauci *et al.* 2010).

La *hipertensión arterial esencial* duplica el riesgo a desarrollar enfermedades cardiovasculares que incluyen cardiopatía coronaria, insuficiencia congestiva cardiaca, enfermedad cerebrovascular isquémica y hemorrágica, insuficiencia renal y arteriopatía periférica. La hipertensión arterial esencial está asociada con otros factores de riesgo como obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, etc. y el riesgo recién mencionado aumenta la carga total de los factores de riesgo cardiovasculares reduciendo la esperanza de vida de los pacientes (Fauci *et al.* 2010, Singh *et al.*, 2010).

A pesar que se sabe que la hipertensión esencial tiene un patrón hereditario (Timberlake *et al.*, 2006) no se ha podido encontrar una causa común que la desencadena, considerándose una patología compleja y multifactorial dada la interacción de componentes genéticos, medioambientales y alteraciones funcionales dentro de los individuos que la padecen (Vikrant & Tiwari, 2001, Singh *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que diversas alteraciones en el sistema renina-angiotensina (RAS), el SNS y el sistema simpatoadrenal intervienen de manera importante en la patogénesis de la hipertensión esencial (Antonaccio & Kerwin, 1981, Grassi *et al.*, 2008, K-Laflamme *et al.*, 1997) resultando en un desbalance en el control de la presión arterial.

Es de nuestro interés y el motivo de este trabajo, examinar las alteraciones que ocurren en el sistema simpatoadrenal durante la fase inicial de la hipertensión arterial esencial (hipertensión fase I) donde existe una hiperactividad en ambos sistemas en pacientes hipertensos (Haffman & Lefkowitz, 2006). Actualmente se ha logrado el control de la presión arterial elevada tras la administración de distintos fármacos como terapia antihipertensiva (mediante el uso de antagonistas de los receptores adrenérgicos) que ejercen su efecto sobre el SNS y el sistema simpatoadrenal (Singh *et al.*, 2010).

Aunado a esto, existen un incremento significativo en los niveles séricos de adrenalina y noradrenalina tanto en pacientes hipertensos como en el modelo animal utilizado para el estudio de la hipertensión arterial esencial (las ratas espontáneamente hipertensas, SHR) en comparación con sus controles normotensos (Goldstein, 1983; Pak, 1981). Un estudio realizado por Hassellund *et al.*, 2010 reportó una respuesta anormal al estrés (físico y/o psicológico) la cual podría estar

implicada en el desarrollo de hipertensión arterial y de enfermedades cardiovasculares. Este grupo de trabajo evaluó diversos parámetros (valores séricos de catecolaminas, presión arterial y frecuencia cardíaca) al realizar dos tareas en un grupo de individuos. Los resultados iniciales fueron comparados con los obtenidos 18 años después realizando las mismas pruebas, mostrando que los sujetos con una actividad exacerbada en el sistema simpatoadrenal ante el estrés tuvieron un mayor riesgo en desarrollar hipertensión arterial.

Nuestro interés está enfocado en estudiar las posibles alteraciones que existan en el sistema simpatoadrenal, en particular, lo que sucede en las células cromafines (CCs) que conforman la médula adrenal. Siendo las CCs adrenales las principales responsables de la liberación de adrenalina y noradrenalina al torrente sanguíneo en el organismo, es muy probable que alteraciones en la secreción de estas dos catecolaminas (CA) por parte de las CCs sean un componente clave en la etapa inicial de la hipertensión arterial esencial.

2. LAS RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR) Y WISTAR KYOTO (WKY)

2.1 MODELO ANIMAL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL ESENCIAL

Con el fin de entender la fisiopatología de la hipertensión arterial esencial se han desarrollado diversos modelos animales, ya sea en su forma genética, inducida farmacológica y/o quirúrgicamente. Estos modelos comparten varias características similares con la hipertensión humana, lo cual ha permitido analizar y disectar de los diversos factores responsables en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial esencial (Dornas & Silva, 2011; Pintérová *et al.*, 2011).

La cepa de ratas espontáneamente hipertensas (*Spontaneously Hypertensive Rats*, SHR) es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la hipertensión arterial esencial. Okamoto & Aoki (1963) en la Universidad de Kyoto desarrollaron esta cepa tras la selección y evaluación de los valores de presión arterial en un grupo de ratas Wistar las cuales mostraron valores promedio de 120-140 mm Hg de presión sistólica. Okamoto & Aoki (1963) observaron que una de las ratas macho examinadas presentó valores elevados de presión sistólica entre 145-175 mm Hg, notando que estos valores se mantuvieron elevados tras el seguimiento de la presión arterial de este espécimen. Dicha rata macho se cruzó con una rata hembra que presentó valores de 130-140 mm Hg de presión sistólica. A partir de las crías obtenidas en esta generación y la subsecuente endogamia, se obtuvo una colonia de ratas que mantuvo de manera uniforme valores elevados de

presión arterial <180 mm Hg (sistólica) a las 20 semanas de edad. (Okamoto & Aoki, 1963; Udenfriend *et al.*, 1976)

Todas las ratas de la cepa SHR desarrollan hipertensión sin ser inducida por regímenes dietéticos, farmacológicos, medioambientales o manipulaciones quirúrgicas de ahí la denominación de la cepa como “*espontáneamente hipertensa*” (Okamoto & Aoki, 1963; Udenfriend *et al.*, 1976; Zicha & Kunes, 1999).

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS RATAS SHR.

Como se ha mencionado, las ratas SHR desarrollan hipertensión en 100% de su colonia (Udenfriend *et al.*, 1976). A partir de las 12 semanas de edad y de manera sostenida, las ratas SHR presentan valores de presión arterial promedio de ~180-200 mm Hg en comparación con valores de ~115-130 mm Hg encontrados en las ratas normotensas WKY (Zicha & Kunes 1999). Es de nuestro interés estudiar las alteraciones que ocurren durante la etapa inicial de la hipertensión arterial (hipertensión fase 1) donde los valores de presión arterial promedio se encuentran aproximadamente son 123-124 mm Hg y comprende de las 7-12 semanas de edad en las ratas.

Entre las características que permiten establecer a la cepa SHR como un modelo de referencia para el estudio de la hipertensión esencial en el ser humano se encuentran: 1) el curso temporal de la enfermedad y las complicaciones derivadas se asemeja a las desarrolladas en el ser humano; 2) la presión arterial tiende a incrementarse conforme avanza la edad del organismo, iniciando este incremento durante las etapas juveniles y manteniéndose elevada en la etapa adulta; 3) las lesiones típicamente asociadas a la hipertensión esencial humana también se manifiestan en estas ratas (*i.e.* hipertrofia ventricular, insuficiencia cardiaca, derrame hemorrágico cerebral, nefroesclerosis y necrosis fibrinoide de arteriolas y pequeñas arterias, etc.); 4) la esperanza de vida de las ratas macho SHR se reduce en promedio a 18 meses de edad siendo para las ratas WKY de 24 meses; 5) existe un componente genético aproximadamente de una tercera parte de la población que predispone a la hipertensión esencial semejante a lo que ocurre en el humano, 6) un efecto agravante tras la ingesta de sodio en las complicaciones hipertensivas y 7) una reducción en las complicaciones derivadas de la hipertensión esencial crónica y un aumento en la esperanza de vida tras la administración de fármacos antihipertensivos (Udenfriend *et al.*, 1976; Dornas & Silva, 2011; Pintérová *et al.*, 2011, Atanur *et al.*, 2010).

Otro aspecto importante a resaltar es que en etapas iniciales de la hipertensión, tanto en las ratas SHR como los pacientes hipertensos, no existen evidencias patológicas ó daños a órganos

blanco (sistema cardiovascular y riñones principalmente) más que la elevación de la resistencia total periférica (valores de presión arterial promedio 123 mm Hg, Udenfriend *et al.*, 1976). Es a partir de las 16 semanas de edad donde se ha reportado evidencias de hipertrofia ventricular para las ratas SHR (Herring *et al.*, 2011) presentándose este tipo de lesiones en los pacientes hipertensos en estadios avanzados (Singh *et al.*, 2010).

En varios estudios y durante la etapa “asintomática”, se ha reportado una elevada actividad del SNS en las ratas SHR (Head, 1989; Judy & Farrell, 1979; Tsuda & Masuyama, 1991) como en los pacientes hipertensos (Grassi *et al.*, 1998, Grassi *et al.*, 2008, Schlaich *et al.*, 2004). Además, un incremento significativo en los niveles séricos de adrenalina y noradrenalina (Goldstein, 1983; Pak, 1981, Vlachakis *et al.*, 1980). Estas alteraciones en el SNS y del sistema simpatoadrenal pueden estar implicadas en el origen y desarrollo de la hipertensión arterial esencial tanto en las ratas SHR como en los seres humanos.

De manera interesante, la cepa de ratas SHR presenta alteraciones conductuales como impulsividad, hiperactividad y déficit de atención posiblemente como resultado de la hiperactividad del SNS y simpatoadrenal, por lo cual, esta cepa ha sido utilizada como modelo para el estudio del Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad (TDAH) en los seres humanos (Yamamoto *et al.*, 2013).

2.3 LAS RATAS WKY COMO CONTROL NORMOTENSO

Debido a se han hecho evidente variaciones bioquímicas y genéticas identificadas entre las colonias de diferentes cepas de ratas normotensas (*i.e.* Wistar, Sprague Dawley, etc.) en comparación con las ratas WKY (Lovenberg *et al.*, 1974; Yamabe *et al.*, 1973), el Comité para el Cuidado y Uso de Ratones Espontáneamente Hipertensas (Udenfriend *et al.*, 1976) ha señalado que la estrategia recomendada al trabajar con ratas SHR es utilizar como control normotenso la cepa de ratas WKY ya que es la cepa de la cual se derivó las ratas SHR (Okamoto & Aoki, 1963).

Para propósitos de este trabajo, todos los resultados obtenidos utilizando las ratas SHR fueron comparados utilizando como control las ratas normotensas WKY.

3. GENERALIDADES DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES

3.1 ANATOMÍA Y FUNCIÓN DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES

Las glándulas adrenales (o también denominadas glándulas suprarrenales) son dos estructuras retroperitoneales, la derecha de forma triangular y la izquierda de forma semilunar en los mamíferos, ambas localizadas por encima de los riñones (Boron & Boulpaep, 2008b) (Fig. 1).

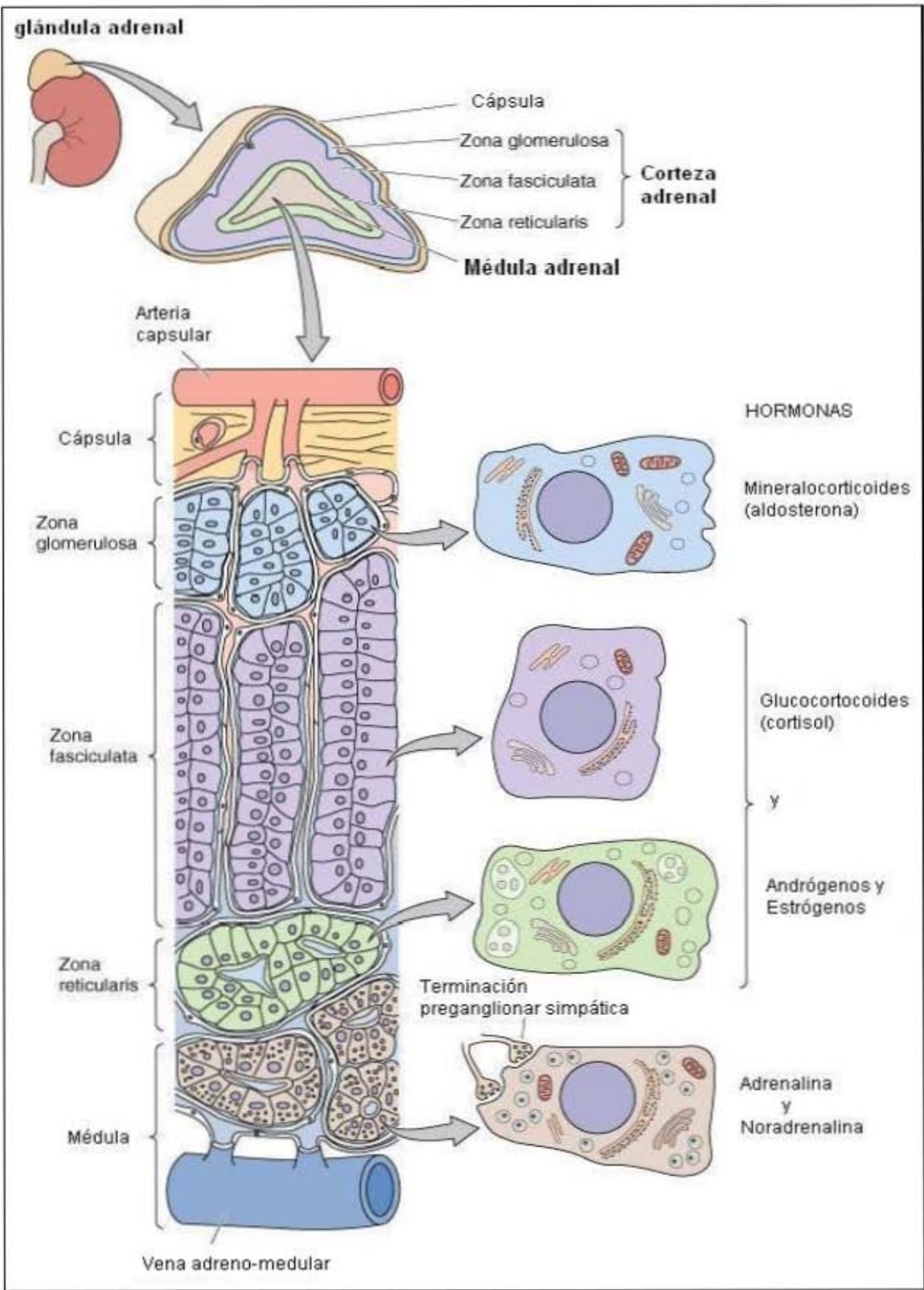
La glándula adrenal está dividida en dos partes: una corteza externa y una sección central, las cuales funcionan como estructuras endócrinas separadas. Esta regionalización entre la *corteza adrenal* y la *médula adrenal* está dada por el distinto origen embriológico de cada una de ellas (Boron & Boulpaep, 2008b; Díaz-Flores *et al.*, 2008) (Fig. 1). Las células que conforman la médula adrenal derivan de la cresta neural (ectodermo) que es el mismo tejido que da origen a los ganglios simpáticos, mientras que la corteza adrenal se deriva del mesodermo.

La médula adrenal sintetiza y secreta principalmente adrenalina y en menor cantidad noradrenalina al torrente sanguíneo en respuesta a la estimulación preganglionar de las fibras nerviosas simpáticas. Por otro lado, la corteza adrenal sintetiza y libera mineralocorticoides (aldosterona) y corticoesteroides (cortisol) en respuesta a la hormona adrenocorticotropa (ACTH) proveniente de la hipófisis anterior, también ante un estímulo estresante. Los mineralocorticoides y glucocorticoides son necesarios para mantener el balance electrolítico y energético en situaciones de estrés, mientras que las CA secretadas por la médula adrenal preparan al organismo para la respuesta de “pelea o huida”. (Boron & Boulpaep, 2008b; Fox, 2011a). De tal forma, podemos decir que la función de la glándula adrenal es mantener la homeostasis del organismo ante los estímulos estresores.

Es tema de nuestro interés y motivo de este estudio enfocarnos en la participación que pudiera tener la médula adrenal generando respuestas anormales al estrés que desemboquen en un corto, mediano o largo plazo en un mayor riesgo en desarrollar hipertensión arterial esencial.

3.2 LA MÉDULA ADRENAL

La médula adrenal forma entre el 10-20% del volumen total de la glándula adrenal, y está constituida principalmente por células cromafines (CCs) (Fig. 1). Las células cromafines (del griego *chroma* = color y del latín *affinis* = afín) son células neuroendocrinas que han sido nombradas así debido a que pueden ser visualizadas por medio de tinciones con sales de cromo.



Estas sales oxidan y polimerizan las dos principales catecolaminas (CA) presentes en la médula adrenal (adrenalina y noradrenalina) visualizándose de color marrón bajo el microscopio (Landsberg & Young, 1992). Las CCs se encuentran organizadas en pequeños cúmulos rodeados por fibras nerviosas, tejido conectivo y vasos sanguíneos (Díaz-Flores *et al.*, 2008) (Fig. 1) La médula adrenal se considera como un ganglio simpático modificado cuyos cuerpos celulares no inervan directamente a un tejido blanco, en cambio, liberan por exocitosis las CA al torrente sanguíneo en respuesta a la estimulación del SNS (Landsberg & Young, 1992; Boron & Boulpaep, 2008b).

La adrenalina es la catecolamina que predomina siendo secretada por la médula adrenal en un 80%, mientras que un 20% lo constituye la noradrenalina. También se ha reportado que las CCs pueden liberar dopamina en un pequeño porcentaje (0.5%, Boksa, 1990). Las dos principales catecolaminas secretadas por las CCs (adrenalina y noradrenalina) se encuentran empaquetadas en gránulos o vesículas dentro de las CCs (Douglas, 1968; Guyton & Hall, 2006a).

4. GENERALIDADES DE LAS CATECOLAMINAS (CA)

4.1 SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE LAS CATECOLAMINAS

Las *catecolaminas* se refiere a los compuestos que contienen un grupo catecol (orto-dihidroxibenceno) además de una cadena lateral con un grupo amino (Fig. 2). La síntesis de las CA comienza con la captación del aminoácido L-tirosina del torrente circulatorio el cual, por acción de la enzima hidroxilasa de tirosina, se transforma en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La L-DOPA es transformada a dopamina por la enzima descarboxilasa de dopamina. Hasta este punto, la secuencia de síntesis se realiza en el citoplasma. La dopamina una vez sintetizada pasa al gránulo de secreción donde la dopamina β -hidroxilasa cataliza su conversión a noradrenalina. La vía de biosíntesis culmina en este paso en el 15% de los gránulos de secreción (gránulos noradrenérgicos). En la mayoría de los gránulos (85%) la noradrenalina regresa al citoplasma, donde por medio de la acción de la enzima PNMT (feniletanolamina-N-metil-transferasa) se sintetiza la adrenalina, la cual vuelve al gránulo de secreción para su almacenaje (gránulos adrenérgicos) (Young, 2003; Kvetnansky *et al.*, 2009, Fig. 2). La expresión y la acción de la enzima PNMT incrementan por efecto de los glucocorticoides provenientes de la corteza adrenal (Hodel, 2001).

Los efectos biológicos de las CA son delimitados por la acción de la enzimas oxidasa de monoaminas (MAO) y por la catecol O-metil transferasa (COMT), que degradan las CA en la propia

médula adrenal y al ser metabolizadas por el hígado. Las CA no degradadas y metabolitos secundarios son excretados por medio de la orina. Las CA liberadas al torrente sanguíneo presentan una vida media de 1-2 minutos (Young, 2003; Kvetnansky *et al.*, 2009)

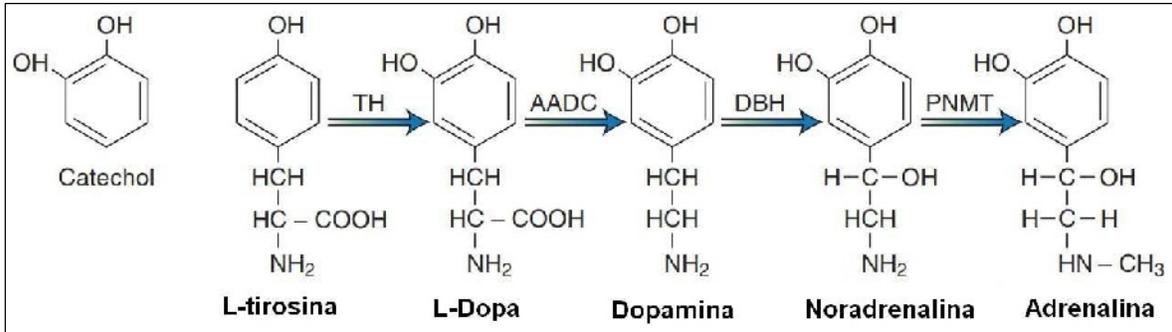


Figura 2. Ruta de biosíntesis de las catecolaminas. Abreviaturas: TH (hidroxilasa de tirosina); descarboxilasa de dopamina (AADC), dopamina β -hidroxilasa (DBH) y feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT, Tomada de Young, 2003).

4.2 EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS CATECOLAMINAS

La adrenalina es el principal efector de la médula adrenal. Aunque la médula adrenal también secreta noradrenalina al torrente sanguíneo, una parte de la noradrenalina circulante proviene de las terminaciones nerviosas simpáticas posganglionares y del encéfalo (*locus coeruleus* y área tegmental ventral) que escapan a la recaptura en la hendidura sináptica (Kvetnansky *et al.*, 2009).

Los efectos biológicos de las CA en los órganos efectores son mediados por los receptores adrenérgicos de los cuales existen dos familias: los alfa (α) y los beta (β). Se han descrito dos subgrupos de receptores alfa (α_1 y α_2) y dos subgrupos de beta (β_1 y β_2). Los receptores adrenérgicos están acoplados a receptores de la familia de las proteínas G. La familia de los receptores α son activados de manera no selectiva por adrenalina y noradrenalina produciendo de manera general vasoconstricción, mientras que los receptores β tiene una mayor afinidad por la adrenalina y regulan la estimulación cardíaca, la broncodilatación y la vasodilatación (Fox, 2011b, Kvetnansky *et al.*, 2009).

Las CA son las responsables de preparar al individuo ante situaciones de emergencia (estrés), siendo responsables de los ajustes homeostáticos rápidos y de corto plazo. Sus acciones impactan al nivel cardiovascular, respiratorio y en la secreción hormonal de otros ejes endocrinos. Entre sus efectos destacan: 1) hiperglucemia y una disminución de la secreción de insulina, 2) incremento del gasto cardíaco y de la presión arterial promedio, 3) redistribución del flujo

sanguíneo, 4) incremento de la temperatura corporal por aumento en el metabolismo en el tejido adiposo y la liberación de hormonas tiroideas, 5) incremento del volumen del líquido extracelular, 6) disminución de la actividad motora gastrointestinal y genitourinaria 7) incremento de la agudeza visual 8) broncodilatación, e 9) incremento en el consumo de oxígeno, entre otras (Guyton & Hall, 2006a, Fox 2011b).

4.3 LAS CATECOLAMINAS SE ENCUENTRAN ALMACENADAS EN LAS VESÍCULAS CROMAFINES

En la médula adrenal de la rata adulta 15-20% de las CCs adrenales poseen fenotipo noradrenérgico, mientras que el 80-85% son adrenérgicas (Coupland 1965c, Hodel, 2001). Las CA producidas en las CCs son almacenadas dentro de estructuras membranosas denominadas vesículas grandes de núcleo denso (*large dense-core vesicles*, LDCV) o vesículas cromafines ocupando un volumen importante en el citosol. En el ser humano, ambas glándulas adrenales contienen aproximadamente 33 μM (6 mg) de CA en las vesículas cromafines, y en las CCs hay alrededor de 10,000 a 30,000 vesículas (Perlman & Chalfie, 1977). De acuerdo al tipo de catecolamina que almacenan (adrenalina o noradrenalina) las vesículas cromafines varían en tamaño (~150-350 nm de diámetro), forma y apariencia electrodensa siendo heterogéneas inclusive dentro de una misma célula (Crivellato *et al.*, 2008).

La importancia de las vesículas cromafines radica en que son el almacén de las CA (aproximadamente 500-1000 mM de CA por gránulo cromafin, Machado *et al.*, 2009) una vez que son sintetizadas dentro de la célula evitando la degradación enzimática en el citosol y posteriormente liberar su contenido por exocitosis. Si bien la formación y maduración las vesículas cromafines aún no se comprende del todo, estos eventos ocurren en el *trans*-Golgi. Se ha reportado que glicoproteínas solubles de la familia de las graninas (cromograninas y secretograninas) son necesarias para la formación de las vesículas de secreción confiriéndoles las características electrodensas (Crivellato *et al.*, 2008; Díaz-Flores *et al.*, 2008).

Las CA no son los únicos compuestos almacenados las vesículas cromafines, se han descrito alrededor de 30 sustancias activas las cuales se encuentran empaquetadas en un volumen de tan sólo 4 aL (atto Litros) y a una osmolaridad teórica de 1.5-2 Osm (osmoles) formando una matriz intravesicular muy densa. La isoosmolaridad del medio extracelular está alrededor de 310 mOsm, por lo tanto, la vesícula cromafin contiene suficientes solutos para quintuplicar la fuerza osmótica del medio extracelular. Gracias a la unión de las cromograninas a las CA es posible una reducción en la fuerza osmótica para mantener la estabilidad de la vesícula

cromafin (Helle, 2000). Al margen de las cromograninas, el coctel intravesicular se complementa con altas concentraciones de ATP (125-300mM) las cuales también contribuyen a reducir de la fuerza osmótica dentro de la vesícula, además de ascorbato (10-30 mM, cofactor en la síntesis de CA), Mg^{2+} , péptidos opioides (Leu-encefalina y Met-encefalina) y varios neuropéptidos de los cuales se desconoce su función de dentro de la médula adrenal, Landsberg & Young, 1992; Crivellato *et al.*, 2008, Machado *et al.*, 2009).

También se encuentra una gran concentración Ca^{2+} dentro de las vesículas cromafines. Aunque la mayor parte del Ca^{2+} se encuentra asociado (quelado) a la matriz vesicular de los (40mM), los gránulos mantienen una fracción libre que alcanza los 50-100 μ M. Ha sido reciente el estudio acerca del papel del Ca^{2+} intravesicular en la exocitosis de los gránulos cromafines y aún no es del todo claro (Machado *et al.*, 2009, Alvarez, 2012).

5. SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS POR LAS CÉLULAS CROMAFINES ADRENALES

5.1 ESTIMULACIÓN DE LA SECRECIÓN

La secreción de las CA en las CCs que conforman la médula adrenal es controlada por las terminales nerviosas preganglionares colinérgicas del SNS provenientes del nervio esplácnico originado entre los segmentos torácicos (T-3) y lumbares (L-3) de la médula espinal (Landsberg & Young, 1992). La inervación del nervio esplácnico penetra hacia la médula adrenal formando haces que se ramifican en su interior y terminan en sinapsis con las CCs (Díaz-Flores *et al.*, 2008) (Fig. 4).

Con base en los experimentos pioneros en glándulas adrenales de gato realizados por Douglas & Rubin (1961a) se determinó que la secreción de CA en la médula adrenal ocurre por la acción del neurotransmisor acetilcolina (ACh), el cual es liberado por las terminaciones axónicas del nervio esplácnico (Fig. 4). Estudios posteriores (Douglas & Rubin, 1961b) demostraron que la ausencia de Ca^{2+} extracelular suprimía la respuesta secretora y que la secreción de CA estaba acompañada por un incremento de la entrada de Ca^{2+} al interior de las CCs (Douglas & Poisner, 1962). W.W. Douglas (1968) propuso el término “acoplamiento entre el estímulo y la secreción” como fundamento de la secreción hormonal y de neurotransmisores siendo la presencia del Ca^{2+} un factor importante entre el estímulo y la respuesta exocitótica.

Las CCs presentan una gran variedad de canales iónicos (proteínas integrales de membrana que forman poros) que permiten la entrada o salida regulada de iones a través membrana celular.

Los canales iónicos son selectivos a distintos los iones (*i.e.* Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) pudiendo ser activados por distintos estímulos (mecánicos, eléctricos o por ligando, Schlegel & Mollard, 1995).

En la célula en reposo (sin estimulación) se presenta una diferencia de potencial eléctrico entre el interior y el exterior celular denominado potencial de membrana (V_m). Este potencial depende de las concentraciones intracelulares y extracelulares de los diferentes iones y de las conductividades relativas de la membrana manteniendo una polaridad en la célula. Para las CCs se ha determinado que el potencial de membrana en reposo se encuentra aproximadamente entre -50 y -60 mV (Wallace *et al.*, 2002, De Diego *et al.*, 2008).

Cuando las terminales axónicas del nervio esplácnico liberan ACh sobre las CCs, se activan dos tipos de receptores de membrana que se unen con alta afinidad a este neurotransmisor. Estos receptores se clasifican en dos grupos principales: los receptores nicotínicos (nAChRs) y los receptores muscarínicos (mAChRs; Coupland, 1989, Fig. 4). La secreción de CA en las CCs es estimulada mayoritariamente por la activación de los nAChRs, que son receptores ionotrópicos los cuales se activan por la unión de ACh aumentando la permeabilidad a cationes principalmente la entrada de Na^+ , despolarizando la membrana celular. Si la despolarización supera el umbral de disparo se generan uno o más potenciales de acción (Fenwick *et al.*, 1982; Kidokoro & Ritchie, 1980; Kidokoro *et al.*, 1982). El potencial de acción es un cambio momentáneo en el voltaje de la célula, que alcanza valores de +30 mV y regresando al voltaje en reposo (-50 a -60 mV) en aproximadamente 10 ms. La generación de los potenciales de acción produce un incremento en la permeabilidad al Ca^{2+} debido a la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática. A su vez, la entrada de Ca^{2+} en la célula incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) la cual promueve la movilización de las vesículas cromafines y la exocitosis de CA (García *et al.*, 2006; De Diego *et al.*, 2008).

La unión de ACh a los mAChR (receptores transmembranales acoplados a proteínas G) promueve la activación de la fosfolipasa C (PLC), produciendo inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) contribuyendo también a la regulación de la secreción de CA en las CCs. La acumulación de IP_3 en el interior celular y su unión a los receptores de IP_3 presentes en el retículo endoplásmico (RE) produce la salida de Ca^{2+} del RE hacia el citoplasma. Este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por la generación de IP_3 se considera como un mecanismo que amplifica la señal de Ca^{2+} inicial producida por los nAChRs (TerBush *et al.*, 1986; O'Sullivan & Burgoyne, 1989).

5.2 EL POTENCIAL DE ACCIÓN

El potencial de acción inicia cuando la célula cromafin se despolariza alcanzando el umbral de disparo y promoviendo la activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje (entre -40 y -

30 mV, Artalejo, 1995, Hollins & Ikeda, 1996). De manera transitoria, la célula cromafin se despolariza hasta llegar a un pico máximo alrededor de los +30 mV (Kidokoro & Ritchie, 1980; Artalejo, 1995; Hollins & Ikeda, 1996). Cuando el voltaje de membrana se aproxima a 0 mV, se activan los diferentes subtipos de CCDV de alto umbral de activación (L, N, P/Q, R). Durante esta fase del potencial de acción se controla el influjo de Ca^{2+} al interior de la célula a través de los CCDV, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; el cual es un proceso decisivo para que se lleve a cabo la fusión de las vesículas cromafines con la membrana para producir la exocitosis de las CA (Artalejo, 1995, Kidokoro & Ritchie, 1980, Nassar-Gentina *et al.*, 1988, Fig. 4).

La repolarización ocurre gradualmente cuando se activan los canales de K^+ dependientes de voltaje y se inactivan a los canales de Na^+ . Durante este periodo, los canales de Ca^{2+} permanecen aún abiertos, por lo cual, la entrada de Ca^{2+} por los CCDV activa la corriente de K^+ tipo BK (Canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}) que son sensibles a cambios en el potencial de membrana y a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se considera que la corriente BK controla la duración del potencial de acción así como el intervalo de tiempo entre los potenciales de acción. La última fase ocurre una hiperpolarización que depende de la activación de las corrientes de K^+ sensibles a Ca^{2+} tanto BK y SK (Hollins & Ikeda, 1996, Schlegel & Mollard, 1995, Fig. 4).

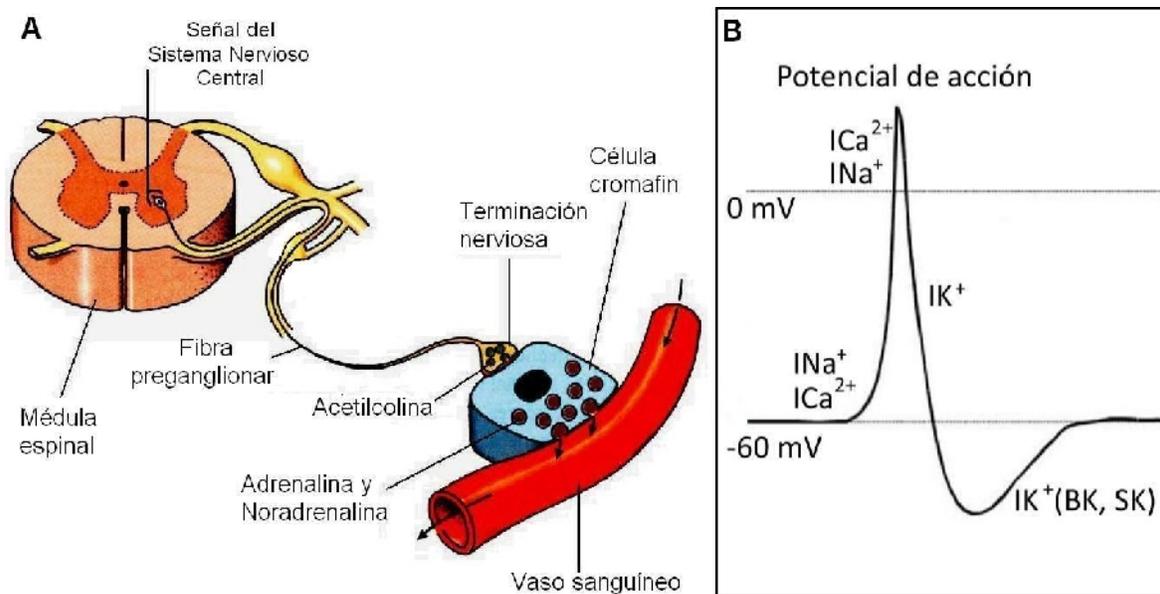


Figura 4. Estimulación de la secreción de CA en las CCs. A) La señal del SNC estimula a las fibras preganglionares del SNS (nervio esplácnico) originadas en la médula espinal. Las terminales nerviosas del nervio esplácnico que inervan a la médula adrenal y liberan ACh que despolariza a las CCs y permitiendo la entrada de Ca^{2+} que promueve la liberación de CA de las vesículas cromafines al torrente sanguíneo. B) Potencial de acción y las diferentes corrientes que se activan durante la transición por los diferentes voltajes (Modificada de Schlegel & Mollard, 1995 y Segura-Chama, 2012).

5.3 LA EXOCITOSIS DE LAS VESÍCULAS CROMAFINES

La exocitosis consiste en la fusión de una vesícula lipídica intracelular a la membrana plasmática de modo que las sustancias almacenadas en el interior de la vesícula se liberan de forma unidireccional al medio extracelular (Camacho *et al.*, 2003). Este proceso está presente en todas las células eucariotas y se genera a través de mecanismos muy conservados. Las células neuroendocrinas (como las CCs) presentan una exocitosis de tipo constitutiva y es activa a bajos niveles de Ca^{2+} en el citosol en la célula en reposo (Jahn *et al.*, 2003; Artalejo, 1995). Por otro lado, la secreción de mensajeros químicos u hormonas depende de una exocitosis finamente regulada por la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, el cual debe superar ciertos valores críticos para activarse (Lukyanetz, 2001). Por lo tanto, para disparar la exocitosis regulada es necesaria la elevación del Ca^{2+} intracelular, la cual se produce tras la apertura de los CCDV activados por ACh ante la propagación de un potencial de acción (Augustine & Neher, 1992, Artalejo, 1995).

Diferentes estudios sobre la naturaleza de la maquinaria secretora han demostrado que la exocitosis requiere de varias etapas sucesivas donde se ven implicadas la interacción y la fina coordinación de complejas estructuras moleculares, que dan lugar al movimiento de vesículas hacia la zona activa, posteriormente al anclado o adosamiento de las vesículas en las zonas de liberación, y finalmente la fusión y la liberación al medio extracelular del contenido almacenado en las vesículas (Camacho *et al.*, 2003).

La secuencia de eventos que están implicados en el movimiento de vesículas hacia la zona activa inicia cuando las vesículas cromafines son empaquetadas en el aparato de Golgi, donde sufren un proceso de ordenación (en inglés *sorting*, Duncan *et al.*, 2003). Una serie de proteínas propias hacen que la célula cromafín las reconozca como tales y las envíe hacia la membrana. En el curso de este camino, las vesículas experimentan una “maduración”. Su interior se acidifica y comienzan a captar las CA, ATP, Ca^{2+} y ácido ascórbico (Camacho *et al.*, 2003). También se reordenan las proteínas de su membrana y de su interior. Los microtúbulos participan activamente en estos movimientos. Posteriormente, la interacción de la actina con otras proteínas contráctiles, como las miosinas II y V, contribuye al acercamiento hacia la zona activa. La actina tiene un doble papel, ya que, por un lado, forma parte de una densa red del citoesqueleto que impide el movimiento y, por otra, es el motor molecular que mueve a las vesículas. El cambio de una a otra función está regulado por el Ca^{2+} a través de una serie de proteínas cortadoras de la actina (Trifaró & Vitale, 1993, Kumarura *et al.*, 1994, Bi GQ, *et al.*, 1997). Antes de la llegada de la vesícula a su “punto de anclaje” en la membrana plasmática, el movimiento de vesículas precisa de un conjunto de proteínas entre las que destacan las dependientes de GTP que controlan el trasiego y la interacción mediada por fosfolípidos (Vitale *et al.*, 2000).

El proceso de anclado de las vesículas en la zona de liberación y la fusión de membranas consiste en la unión de dos bicapas de fosfolípidos en medio acuoso. La aproximación de las membranas lipídicas de la vesícula y de la célula cromafin requiere del acercamiento forzado mediante una serie de proteínas para que sea posible el intercambio de las moléculas de fosfolípidos (Camacho *et al.*, 2003). El descubrimiento de estos motores moleculares dio origen a la hipótesis del complejo SNARE (del inglés *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), que trata de explicar cómo se lleva a cabo la exocitosis (Söllner *et al.*, 1993, Li & Chi, 2003, Camacho *et al.*, 2003). La idea inicial de esta hipótesis es considerar a la maquinaria de fusión alrededor de dos proteínas solubles: una ATPasa denominada NSF (*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*), considerada como un factor imprescindible para la fusión vesicular, y una segunda proteína, que se une a NSF, llamada α -SNAP (*soluble NSF-attachment protein*). El conjunto formado por ambas une las vesículas a un receptor específico para SNAP, el llamado SNARE (SNAP receptor). La hipótesis SNARE ha dado origen a una explosión de trabajos encaminados a establecer las bases moleculares del proceso secretor (Söllner *et al.*, 1993; Südhof, 1995, Li & Chi, 2003). La función de cada una de las proteínas involucradas en la cascada del complejo de fusión y su regulación no está aún del todo clara, sobre todo considerando que constantemente se identifica una nueva proteína “esencial” (Camacho *et al.*, 2005). Según el modelo propuesto por Südhof, 1995, la maquinaria de fusión se compone de dos grupos de proteínas: las que tradicionalmente se denominaron proteínas solubles citoplasmáticas, como la NSF y la α -SNAP; y las proteínas SNARE. En las neuronas y en las CCs se han identificado básicamente tres de ellas, una predominante en la membrana vesicular (v-SNARE), la proteína de membrana asociada a vesículas (VAMP, también llamada sinaptobrevina) y dos en la membrana plasmática (t-SNARE): la sintaxina y la SNAP25 (proteína de 25 kDa asociada a sinaptosoma, Jahn & Südhof, 1999, Südhof, 2000). Otra proteína vesicular, la sinaptotagmina I, se ha propuesto como el sensor o detector del Ca^{2+} en la última etapa de la exocitosis (Fernández-Chacón *et al.*, 1995; Südhof, 2000). Esta proteína compite con la proteína α -SNAP por unirse al complejo SNARE y puede impedir la fusión por bloqueo del ensamblaje del aparato general de fusión. Tras la entrada del Ca^{2+} , la sinaptotagmina I se disocia del complejo SNARE y permite la unión de α -SNAP y el desencadenamiento del proceso de fusión. El último estadio de la exocitosis está regulado prácticamente solo por el Ca^{2+} e intervienen la sinaptotagmina I y el complejo SNARE. A partir de aquí se puede iniciar la unión de la membrana vesicular con la plasmática y concluir la formación del poro de fusión. El proceso de fusión sólo se inicia una vez que el NSF es hidrolizado por ATP. El ATP actúa como sustrato para distintas quinasas lipídicas que degradan moléculas como el fosfatidilinositol (Südhof, 2000). El NSF parece catalizar de forma dependiente de ATP, el desensamblaje del complejo proteico SNARE (Steyer *et al.*, 1997, Camacho *et al.*, 2003).

Finalmente, durante la fusión se forma un poro acuoso que establece la comunicación entre los dos compartimentos. Durante unos milisegundos se forma un poro que une el espacio

extracelular con el lumen vesicular. Este poro permite un flujo de salida de la fracción libre de CA (44 mM, Camacho *et al.*, 2003). Se calcula que cada milisegundo pasan por el poro de fusión unas 34.000 moléculas (Schroeder *et al.*, 1996). El poro de fusión va a permitir la entrada de agua y de iones extracelulares al lumen de la vesícula cromafín. Si esta entrada supera cierto umbral, se produce un brusco hinchamiento de la vesícula. Este proceso va seguido del ensanchamiento del poro de fusión hasta formar la estructura en ω (omega). La matriz intravesicular se disocia y se vierte todo el contenido al espacio extracelular (Schroeder *et al.*, 1996, Steyer *et al.*, 1997, Camacho *et al.*, 2003).

6. LAS SEÑALES DE Ca^{2+} EN LAS CÉLULAS CROMAFINES ADRENALES

La exocitosis de CA está mediada principalmente por la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular a través de los CCDV localizados en la membrana plasmática (Augustine & Neher, 1992). Los CCDV constituyen elementos importantes para producir un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y desencadenar el proceso de exocitosis. En las CCs, los CCDV del tipo L contribuyen casi al 50% del total de la corriente de Ca^{2+} (ICa^{2+}) en las CCs de la rata, mientras que el resto lo constituyen los tipo N (30%) y P/Q (20%) (Gandía *et al.*, 1995). La activación de los CCDV promueven la generación de potenciales de acción que controlan la secreción de CA, además regulan los eventos dependientes de Ca^{2+} que se originan cerca de la membrana celular desde el transporte, anclaje, fusión de las vesículas cromafines y liberación de su contenido (García *et al.*, 2006, Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002, Mahapatra *et al.*, 2012).

Además de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV, las CCs poseen otros mecanismos capaces de aumentar el Ca^{2+} citosólico mediante la liberación de Ca^{2+} proveniente de las pozas intracelulares por parte del retículo endoplasmático (RE) a través de receptores de Rianodina (RyR) y/o de IP_3R y por la reversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática (Pan & Kao, 1997, Berridge, 2002, Yang & Kao, 2001).

Además, las CCs poseen varios mecanismos de recaptura o remoción de Ca^{2+} como la ATPasa de Ca^{2+} y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana plasmática (NCX), junto con la ATPasa de Ca^{2+} en el RE y la mitocondria (Herrington *et al.*, 1996; Pan & Kao, 1997; Yang & Kao, 2001). Estos mecanismos juegan un papel importante en la formación y distribución espacio-temporal de las señales de Ca^{2+} que contribuyen a regulación de la exocitosis de CA en las CCs (Alonso *et al.*, 1999; Villalobos *et al.*, 2002; García *et al.*, 2012).

6.1 LAS POZAS INTRACELULARES DE Ca^{2+} : IMPORTANCIA DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Las CCs poseen varios compartimientos intracelulares capaces de acumular Ca^{2+} en su interior siendo el más importante el conformado por el RE. Este organelo posee una gran capacidad de acumular Ca^{2+} por la presencia de la bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplasmático o SERCA (del inglés, *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*, Poulsen *et al.*, 1995). SERCA se localiza en la membrana del RE y transporta Ca^{2+} desde el citosol contra-gradiente lo cual genera un gasto de energía (ATP) y permite la acumulación de Ca^{2+} en el lumen del RE. La presencia de dicha bomba permite la formación de un gradiente de Ca^{2+} entre el lumen del RE y el citosol. La concentración de Ca^{2+} basal es del orden de $\sim 500 \mu\text{M}$ en el RE y $\sim 100 \text{nM}$ en el citosol (Pozzan *et al.*, 1994; Meldolesi & Pozzan, 1998) lo que habilita al RE a ser una fuente potencial de este catión.

La participación del RE en la generación de las señales de Ca^{2+} ha sido descrita en distintos tipos celulares, donde desempeña central en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico (Endo *et al.*, 1970; Inoue *et al.*, 2003; Rigual *et al.*, 2002; García *et al.*, 2012). El RE posee canales que son regulados por mensajeros intracelulares específicos, permitiendo la liberación de Ca^{2+} hacia el citosol (Berridge, 2003; Inoue *et al.*, 2003). En el RE existen dos tipos de canales activados por ligando: 1) los canales de inositol 1,4,5-trifosfato o IP_3 (IP_3R) cuyo principal ligando es el IP_3 ; y 2) los receptores de Rianodina (RyR) nombrados así por unirse al ligando exógeno Rianodina (Ry). La Ry ejerce un efecto agonista o antagonista sobre los RyR dependiendo de la concentración utilizada (Vites & Pappano, 1994; Sutko *et al.*, 1997) (Fig. 5).

Los RyR son activados fundamentalmente por concentraciones de Ca^{2+} intracelular menores a las necesarias para activar a los IP_3R . Por lo tanto, un aumento del Ca^{2+} citosólico provocado por la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV puede activar por sí solo a los RyR. La activación de los RyR produce la salida de Ca^{2+} del RE contribuyendo a un mayor aumento del Ca^{2+} citosólico respecto al incremento de Ca^{2+} inicialmente generado por la apertura de los CCDV. Por lo tanto, las señales generadas por el RE actúan como mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+} . A este fenómeno se la ha denominado liberación de Calcio inducida por Ca^{2+} (del inglés *Calcium-induced Ca^{2+} release*, CICR) la cual ha sido descrita principalmente en las células del músculo cardíaco y en menor grado en las células del músculo esquelético (Endo *et al.*, 1970; Fabiato, 1983, Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002).

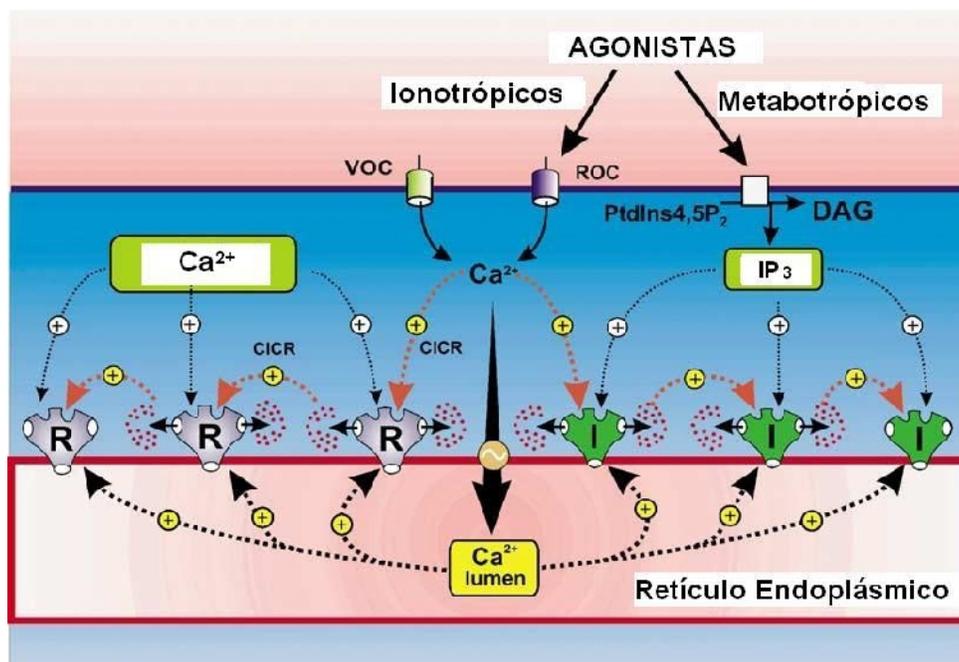


Figura 5. El papel de RE en la generación de CICR. El RE posee receptores de Rianodina (R) y receptores de IP₃ (I) los cuales son canales sensibles a Ca²⁺ que liberan Ca²⁺ a través de CICR. La señal de Ca²⁺ puede provenir del medio extracelular tras la activación de los VOCs (Canales operados por voltaje) o ROCs (Canales operados por Receptor) incrementando el Ca²⁺ intracelular, lo cual genera la activación los receptores de Rianodina a que liberan más Ca²⁺ hacia el citosol, amplificando la señal de Ca²⁺ por CICR. Los receptores de IP₃ son sensibles a Ca²⁺ y a la producción de segundos mensajeros como el IP₃ (Tomado y modificado de Berridge, 2002).

6.2 LIBERACIÓN DE CALCIO INDUCIDA POR Ca²⁺ (CICR) EN LAS CÉLULAS CROMAFINES ADRENALES

En las CCs los cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico no dependen solamente de la entrada de Ca²⁺ a través de los CCDV sino también de la CICR generada por el RE y la recaptura de Ca²⁺ al interior de este organelo (Llano *et al.*, 1994; Alonso *et al.*, 1999, Inoue *et al.*, 2003; Rigual *et al.*, 2002). Ha sido hasta recientes décadas que se ha estudiado la participación de CICR en las CCs y se ha podido monitorear los cambios en la concentración de Ca²⁺ dentro del RE ([Ca²⁺]_{ER}) en las CCs (Alonso *et al.*, 1999).

¿Cuál es la importancia de CICR en la secreción de CA en las CCs? ¿Es suficiente el incremento en la [Ca²⁺] intracelular por parte de CICR para desencadenar el proceso de exocitosis en las CCs? Si se considera que CICR disminuye la [Ca²⁺]_{ER} en 100-200 μM, esto corresponde a un incremento en el Ca²⁺ citosólico de 1-2 μM. El RE ocupa un 10% del volumen total de la célula y además el 90% del Ca²⁺ proviene del RE. Efectivamente, el incremento generado en la [Ca²⁺] intracelular por CICR alcanza rangos suficientes (0.1 a 50 μM) para estimular de forma efectiva el

transporte de las vesículas cromafines hacia la membrana plasmática para su exocitosis (Poisner, 1973; Pozzan *et al.*, 1994; Mendolesi & Pozzan, 1998; Neher, 1998).

Además, la liberación de Ca^{2+} del RE hace posible que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ genere un aumento súbito en los gradientes subcelulares de Ca^{2+} de la membrana plasmática de la célula cromafin favoreciendo el aumento casi al doble de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico. Por lo tanto, la generación de potenciales de acción y la activación de los RyR desencadena CICR permitiendo que la señal de Ca^{2+} se genere rápidamente (Poisner, 1973, Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002).

Alonso *et al.*, 1999 demostró que tras el vaciamiento completo del Ca^{2+} del RE mediante cafeína, los primeros 2 o 3 pulsos despolarizantes (con alto K^+) contribuyen a restablecer nuevamente el reservorio de Ca^{2+} del RE. La cafeína produce prácticamente la liberación completa del Ca^{2+} almacenado en el RE (Poisner, 1973, Lim *et al.*, 1991). Se ha propuesto que cuando el RE de Ca^{2+} se encuentra vacío, el RE se comporta como almacén, reduciendo la cantidad de Ca^{2+} disponible para desencadenar la liberación de CA. Después de varios pulsos despolarizantes con alto K^+ , la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ alcanza su capacidad máxima (aproximadamente 300 μM) por lo tanto, el RE no es capaz de introducir más Ca^{2+} al interior de este reservorio. Como resultado, existe más Ca^{2+} en el citosol disponible para la exocitosis y se produce un incremento en la liberación de CA en las CCs. Cuando se restablece por completo las reservas de Ca^{2+} en el RE, este es capaz de contribuir y liberar Ca^{2+} al citosol vía CICR promoviendo la exocitosis de CA (Alonso *et al.*, 1999, García *et al.*, 2006; García *et al.*, 2012, Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002, Lim *et al.*, 1991, Lara *et al.*, 1997).

De forma interesante, la generación de CICR es más eficaz para inducir la exocitosis tras la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV de tipo P/Q en comparación con los CCDV tipo L y N sugiriendo que CICR puede ocurrir preferentemente cerca de los CCDV tipo P/Q. (Lomax *et al.*, 1997, Lara *et al.*, 1998). Por lo tanto, el papel de CICR es importante en la regulación de la respuesta secretora en condiciones fisiológicas dentro de las CCs (Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002, Alonso *et al.*, 1999).

II. ANTECEDENTES

La hipertensión arterial es un problema grave de salud pública y mundial. Las causas que originan el desarrollo de la hipertensión esencial en los seres humanos aún se desconocen considerándose una enfermedad multifactorial y con un importante componente genético aún no esclarecido. Diversos reportes señalan que alteraciones en el sistema renina-angiotensina (RAS), en el SNS y en el sistema simpatoadrenal podrían estar involucradas en la fisiopatología de esta enfermedad (Antonaccio & Kerwin, 1981, Grassi *et al.*, 2008, K-Laflamme *et al.*, 1997) ya que se encargan del control del tono vascular y la regulación de la presión arterial. Además, en los pacientes hipertensos se alcanza una disminución en los valores de la presión arterial tras el uso concomitante de distintos fármacos que tienen como blanco terapéutico uno o varios de los componentes del SNS, RAS y el sistema simpatoadrenal. Este hecho apoya la hipótesis de que alteraciones en uno o varios de estos sistemas influyen en la patogénesis de la hipertensión esencial (Singh *et al.*, 2010).

Este trabajo de investigación está enfocado en examinar las posibles alteraciones del sistema simpatoadrenal durante la etapa inicial de la hipertensión esencial ya que han sido poco estudiadas y se desconocen los mecanismos que subyacen a dichas alteraciones. Además, existen varias evidencias que llaman nuestra atención donde se señala la importancia y la participación del sistema simpatoadrenal en la génesis y en el establecimiento de la hipertensión esencial.

Por un lado, existe una elevación en los valores séricos para noradrenalina y un incremento en la frecuencia cardíaca en pacientes jóvenes pre-hipertensos (Julius *et al.*, 1991) De igual forma, estudios en pacientes pre-hipertensos existe una hiperactividad del SNS tras evaluar los valores de presión arterial junto con la actividad simpática (mediante microneurografía y valores de presión arterial pulso-por-pulso; Anderson *et al.*, 1989, Grassi *et al.*, 1998). Aunado a esto, se ha reportado un incremento significativo en los valores séricos de adrenalina y noradrenalina en los pacientes hipertensos en comparación con los pacientes normotensos (Goldstein 1983, Goldstein *et al.*, 1983) reportándose valores de 0.370 ng/ml en los pacientes hipertensos vs 0.218 ng/ml (CA totales) en individuos normotensos cuantificado por ensayo radiométrico (De Champlain, 1976).

De igual manera, Hassellund *et al.*, 2010 tras evaluar diversos parámetros de la respuesta cardíaca y los niveles séricos de CA en un grupo de individuos, demostró que los sujetos que presentaron una respuesta anormal al estrés tuvieron un mayor riesgo de desarrollar hipertensión arterial y enfermedades cardiovasculares. Los parámetros obtenidos de los individuos fueron comparados inicialmente y 18 años después sometiéndose a las mismas pruebas de estrés físico y

psicológico. Estos resultados sugieren que una actividad exacerbada a largo plazo del sistema simpatoadrenal podría estar implicada en la génesis de la hipertensión arterial.

Se ha observado que un incremento en los niveles séricos de adrenalina y noradrenalina en los pacientes que presentan un tumor en la médula adrenal (feocromocitoma) lo cual provoca un aumento en los valores de presión arterial y el desarrollo de hipertensión arterial. Una vez que el tumor es extraído quirúrgicamente en estos pacientes, los valores de presión arterial junto con los valores séricos de CA regresan a rangos normales (Landsberg & Young, 1992). Por lo tanto, alteraciones en el sistema simpatoadrenal podrían estar involucradas en la génesis de la hipertensión arterial (Currie *et al.*, 2012).

De igual forma, los resultados utilizando como modelo a la rata SHR también apuntan a que alteraciones al nivel del SNS y del sistema simpatoadrenal están implicadas en el desarrollo de la hipertensión esencial similar a lo que ocurre en los seres humanos. En las ratas SHR pre-hipertensas (4-6 semanas de edad) se ha demostrado que presentan también una elevada actividad del SNS (Head, 1989; Judy & Farrell, 1979; Tsuda & Masuyama, 1991). Además, presentan un incremento significativo en los niveles séricos de adrenalina y noradrenalina (Pak, 1981, Vlachakis *et al.*, 1980) en comparación con las ratas normotensas WKY. Vlachakis *et al.*, 1980 reportó que los valores séricos de CA son significativamente mayores en las ratas SHR para noradrenalina: 356 ± 67 pg/ml en SHR en comparación con 297 ± 61 pg/ml en WKY; y adrenalina: 1079 ± 117 pg/ml en SHR en comparación con 695 ± 107 pg/ml en WKY cuantificados por ensayo radioenzimático.

Además, Lee *et al.*, 1987 demostró que tras realizar una simpactectomía en las arterias periféricas utilizando anti suero contra NGF (*Nerve Growth Factor*, factor de Crecimiento Neuronal) y guanetidina (agonista de los receptores α -2-adrenérgicos periféricos) durante las primeras 4 semanas de edad, los valores de presión arterial en las ratas SHR simpactectomizadas (valor sistólico 139 ± 2 mm Hg) disminuyeron ligeramente siendo aún mayores en comparación con su control normotenso WKY sin tratamiento (115 ± 4 mm Hg) y en comparación con las ratas WKY simpactetomizadas (112 ± 5 mm Hg). Por otra parte, cuando las ratas SHR fueron simpactetomizadas utilizando solamente anti suero contra NGF no se observó una disminución en los valores de presión arterial (160 mm Hg) ni se evitó el desarrollo de la hipertrofia ventricular característica de la etapa avanzada.

Con el fin de examinar si el incremento en los valores séricos de CA podrían estar implicados en el desarrollo de la hipertensión arterial, Tung *et al.*, 1981 demostró que tras implantar intraperitonealmente una bomba miniosmótica de liberación lenta de adrenalina en un grupo de ratas normotensas se produjo un incremento en los valores de presión arterial después de 2-6 días

del implante. Majewski *et al.*, 1981 sugirió que la adrenalina podría estar ejerciendo su efecto y facilitando la acción de los receptores α -adrenérgicos presinápticos de los nervios simpáticos que inervan los efectores cardiovasculares generando la elevación de los valores de presión arterial. Por lo tanto, estos autores sugieren que la adrenalina proveniente de la médula adrenal podría estar implicada en la génesis de la hipertensión arterial.

Borkowski & Quinn 1983 demostraron que tras la eliminación de la médula adrenal (desmedulación quirúrgica) en ratas SHR púberes (50-60 g de peso) los valores de presión arterial fueron menores en las ratas SHR desmeduladas (170 mm Hg) en contraste con los valores de presión arterial en las ratas SHR control (210 mm Hg). Sin embargo, cuando dicha desmedulación se realizó en ratas SHR adultas (250-325 g de peso) los valores de presión arterial no se modificaron.

Lee *et al.*, 1991 también observaron que la hipertensión arterial en las ratas SHR fue prevenida tras simpactectomizar a ratas neonatas (técnica descrita Lee *et al.*, 1987) sin embargo, los valores de presión arterial en las ratas SHR aún fueron mayores a los obtenidos en las ratas WKY. De forma interesante observaron una disminución en los valores de presión arterial en las ratas SHR (120 ± 6 mm Hg) combinando el efecto de la simpatectomía más la desmedulación, acercándose los valores de presión arterial a los registrados en las ratas normotensas WKY (108 ± 1 mm Hg). Por lo tanto, en este trabajo se concluye que los valores de presión arterial elevados son mantenidos por la glándula adrenal en las ratas SHR simpactectomizadas.

Como se ha mencionado, diversos estudios muestran que las ratas SHR tienen un incremento en los valores séricos de CA circulantes desde la etapa pre-hipertensiva. ¿Es posible que glándula adrenal de las ratas SHR libere más CA en comparación con las ratas WKY? Para contestar esta interrogante, Lim *et al.* 2002 cuantificaron por fluorometría la liberación de CA por perfusión colectada durante 4-8 min de las glándulas adrenales aisladas de ratas SHR y WKY adultas. Ellos demostraron que la secreción de CA tras una estimulación colinérgica (mediante ACh) y tras una despolarización con alto K^+ fue mayor en las glándulas adrenales de las ratas SHR en comparación con las ratas WKY. Por lo tanto, estos resultados señalan que una mayor liberación de CA en la glándula adrenal podría estar involucrada en el desarrollo de la hipertensión esencial.

Recientemente, Miranda-Ferreira *et al.*, 2008 evaluaron la liberación de CA en las CCs adrenales en cultivo provenientes de ratas de 16 semanas de edad de la cepa SHR y Sprague-Dawley mediante la técnica de amperometría. La amperometría tiene la ventaja de monitorear la dinámica de la secreción de CA en tiempo real al nivel de gránulos secretores individuales en comparación con la metodología utilizada por Lim *et al.* 2002 (para más detalles Ver Metodología).

Los resultados de este estudio mostraron que al estimular las CCs adrenales mediante un pulso de 1 mM de ACh o tras una despolarización con K^+ 70 mM, las CCs de ratas SHR liberaron una mayor cantidad de CA y por un periodo de tiempo mayor en comparación con las CCs de ratas Sprague-Dawley. (Fig. 6, parte 1 y 2).

Es importante resaltar que en la mayoría de los estudios (incluyendo Miranda-Ferreira *et al.*, 2008) se han utilizado ratas en edades en etapas de hipertensión avanzada (>16 semanas de edad). Pocos estudios se han enfocado en investigar lo que sucede previo a presentarse las complicaciones y los daños en órganos característico de etapas avanzadas de la hipertensión esencial (hipertensión fase 2). Por lo tanto, es de gran importancia para nosotros realizar estudios que nos ayuden a elucidar las alteraciones que suceden a etapas iniciales de la hipertensión esencial (en ratas de 12 semanas de edad). De acuerdo las evidencias mencionadas surge la pregunta acerca de ¿qué mecanismos podrían estar implicados en la hipersecreción de CA en las ratas SHR y por lo tanto, repercutiendo en la génesis y/o desarrollo temprano de la hipertensión esencial en esta cepa?

Un evento crucial en la exocitosis de CA en las CCs adrenales es el incremento del $[Ca^{2+}]$ intracelular que dispara la movilización de las vesículas y la liberación de CA al espacio extracelular tras fusionarse con la membrana plasmática. La entrada de Ca^{2+} a través de la activación de los CCDV es un factor muy importante en el incremento del $[Ca^{2+}]$ intracelular y en la liberación de CA de las vesículas de secreción. Con el fin de examinar si la participación de la entrada de Ca^{2+} a través de la activación de los CCDV en las CCs podría ser la causa de una mayor secreción de CA por parte de las CCs en las ratas SHR, en un estudio realizado en nuestro laboratorio (Segura-Chama *et al.*, 2010) examinó las propiedades electrofisiológicas de los CCDV de las CCs obtenidas de rebanadas de la glándula adrenal proveniente de ratas WKY y SHR de 7-12 semanas de edad (edad correspondiente a la hipertensión arterial fase 1). Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas en las propiedades de la corriente de Ca^{2+} ($I_{Ca^{2+}}$) en las CCs de ambas cepas. Esto sugiere que una mayor entrada de Ca^{2+} al interior de las CCs no parece ser un factor desencadenante en la hipersecreción de CA de las CCs de las ratas SHR durante el inicio de la hipertensión esencial.

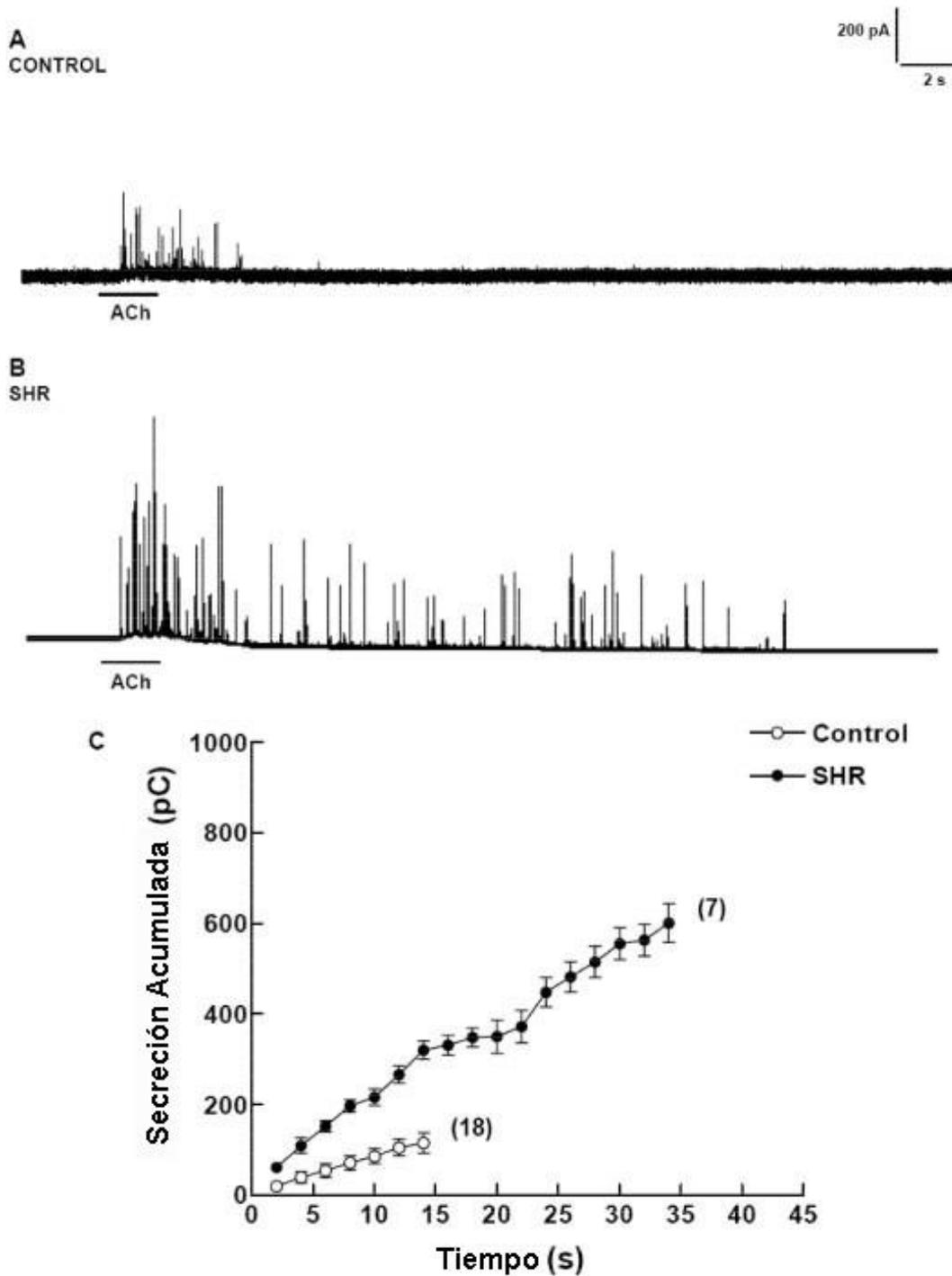


Figura 6, Parte 1. Liberación de CA en las CCs adrenales de ratas SHR y normotensas Sprague-Dawley tras la aplicación de un pulso ACh 1 mM (durante 2 s). Registros amperométricos representativos de la secreción de CA en las CCs. Cada espiga equivale a la oxidación de las CA liberadas por la fusión de una vesícula con la membrana plasmática. A) Control normotenso, B) SHR y C) Comparación de la carga acumulada a lo largo del tiempo de las espigas amperométricas obtenidas tras el estímulo para ambas cepas, la cual se obtuvo sumando la integral de la corriente generada de todas las espigas (pC). (Tomado de Miranda-Ferreira *et al.*, 2008).

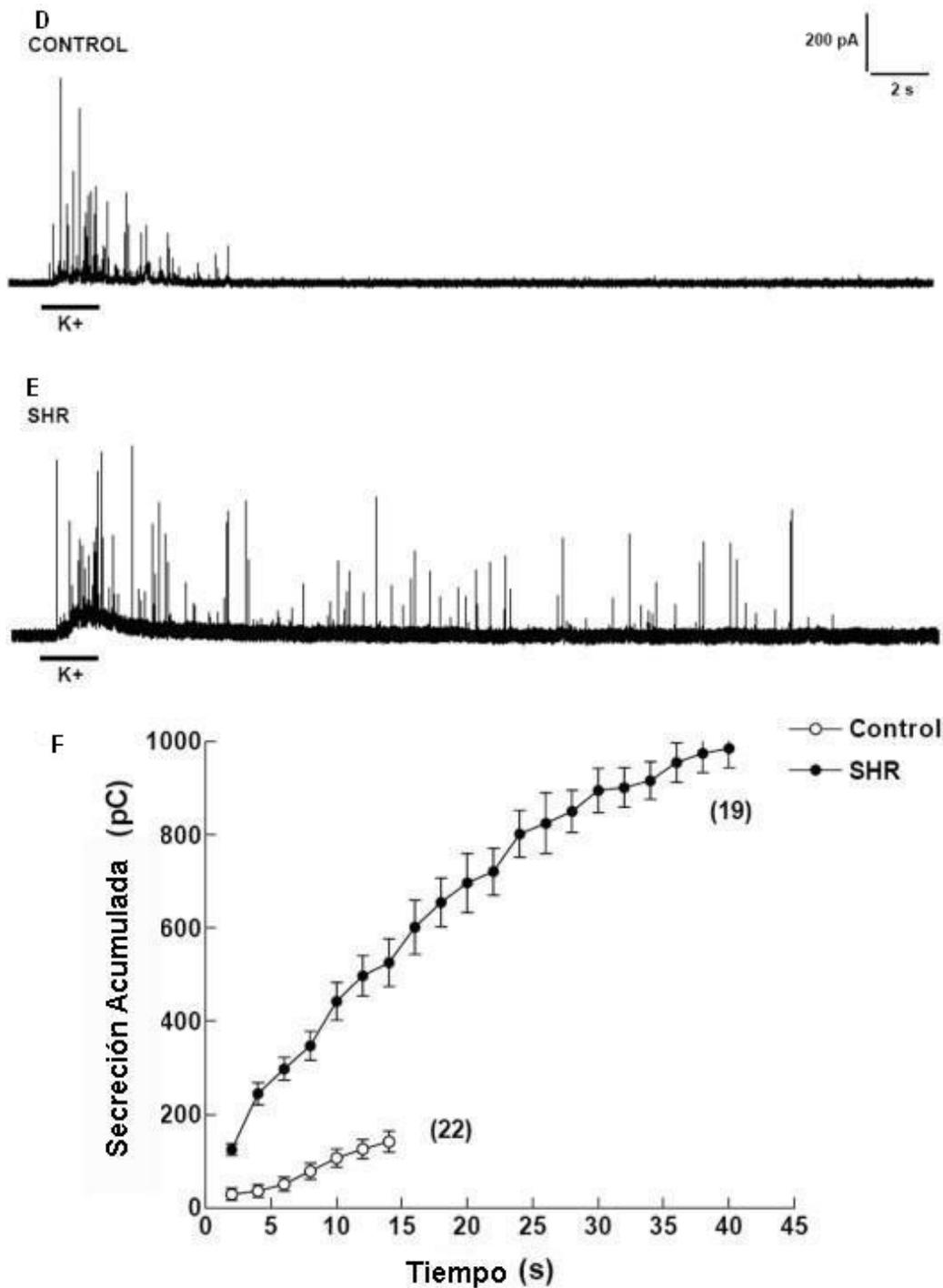


Figura 6, Parte 2. Liberación de CA en las CCs adrenales de ratas SHR y normotensas Sprague-Dawley tras la aplicación de un pulso K^+ 70 mM (durante 2 s). Registros amperométricos representativos de la secreción de CA en las CCs. Cada espiga equivale a la oxidación de las CA liberadas por la fusión de una vesícula con la membrana plasmática. A) Control normotenso, B) SHR y C) Comparación de la carga acumulada a lo largo del tiempo de las espigas amperométricas obtenidas tras el estímulo para ambas cepas, la cual se obtuvo sumando la integral de la corriente generada de todas las espigas (pC). (Tomado de Miranda-Ferreira *et al.*, 2008).

Sin embargo, otros mecanismos como la salida de Ca^{2+} de las pozas intracelulares pueden incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular influyendo en la liberación de CA de las vesículas cromafines. Las pozas intracelulares de Ca^{2+} pueden actuar secuestrando Ca^{2+} del citosol (y por consiguiente disminuyendo la señal de Ca^{2+}) o liberándolo hacia el citosol (por lo tanto amplificando la señal de Ca^{2+}). Los resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio (Jiménez-Pérez *et al.*, 2013) han demostrado que existe un incremento significativo en la amplitud de la señal de Ca^{2+} intracelular de manera basal, tras una despolarización con alto K^+ o tras un pulso con cafeína 10 mM en las CCs de las ratas SHR vs WKY de 8-10 semanas de edad en rebanadas de glándula adrenal.

Recientemente Li *et al.*, 2012 demostraron que en neuronas en cultivo del ganglio simpático cervical superior existe un mayor contenido de Ca^{2+} disponible en el RE, así como una mayor amplitud de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por cafeína en ratas pre-hipertensas SHR (4-6 semanas de edad) en comparación con las neuronas de las ratas WKY cuantificada por imagenología de Ca^{2+} utilizando Fura-2AM. Por lo tanto, es posible que un incremento en la movilización de Ca^{2+} de las pozas intracelulares (específicamente la contribución del RE) esté participando en la hipersecreción de CA observada en las CCs de las ratas SHR influyendo en el desarrollo de la hipertensión arterial esencial.

En este proyecto nos planteamos las siguientes preguntas: ¿La participación del Ca^{2+} proveniente del RE influye en una mayor o menor liberación de los gránulos de secreción de CA en las CCs en las ratas WKY y SHR? ¿Es distinta en las dos cepas? Sí es diferente ¿cómo influye en la hipersecreción de CA en las CCs de las ratas SHR en etapas iniciales de la hipertensión arterial?

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La incidencia de la hipertensión arterial es un grave problema de Salud Pública y al nivel mundial. Aunque no conocen con exactitud los mecanismos implicados en la génesis y/o desarrollo inicial de la hipertensión esencial, se ha reportado un incremento significativo en los niveles séricos de CA en los pacientes hipertensos y en el modelo animal de hipertensión esencial (las ratas SHR). Además, existe una mayor secreción de CA de la glándula adrenal aislada en las ratas SHR en comparación con las ratas normotensas WKY. Sin embargo, se desconoce a qué nivel del acople “estímulo-secreción” pueden encontrarse las alteraciones que explican dichas diferencias.

Un estudio previo de nuestro laboratorio (Segura-Chama *et. al*, 2010) demostró que no existen diferencias significativas en las propiedades electrofisiológicas de la corriente de Ca^{2+} al examinar las CCs de las ratas de la cepa SHR y WKY. Esto sugiere que la hipersecreción de CA de las CCs de las ratas SHR no es producida por una mayor entrada de Ca^{2+} en las CCs a través de los CCDV en la etapa inicial de la hipertensión esencial.

Sin embargo, cabe destacar que en la dinámica y la homeostasis de la concentración de Ca^{2+} intracelular en las CCs participan las pozas intracelulares de Ca^{2+} (principalmente el RE) que pueden modificar la señal de Ca^{2+} del citosol influyendo en la exocitosis de CA en las CCs. Hasta el momento, no se ha estudiado el papel que pueda tener el RE en la hipersecreción de CA en CCs de las ratas SHR.

Por esta razón, este estudio se enfocó en examinar si la movilización masiva y/o vaciamiento de Ca^{2+} del RE puede explicar la hipersecreción de CA en las CCs en las ratas SHR. De ser así, puede esperarse que el bloqueo de la salida de Ca^{2+} del RE disminuya la hipersecreción de CA de las CCs de ratas SHR determinando que la liberación de CA se asemeje a la de las ratas normotensas WKY.

Los resultados de este estudio son relevantes para una mejor comprensión de los mecanismos implicados en el establecimiento de la hipertensión esencial, ayudando a la identificación de blancos moleculares y al futuro desarrollo de mejores estrategias farmacológicas para los pacientes hipertensos desde las etapas iniciales de esta enfermedad.

IV. HIPÓTESIS

El aumento en la liberación de CA en las CCs de las ratas SHR se debe a una mayor liberación de Ca^{2+} del RE mediante CICR en las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY.

V. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Comparar la liberación de CA basal y estimulada de las CCs adrenales en cultivo mediante la técnica de amperometría con el fin de estudiar si las CCs de las ratas SHR tienen mayor secreción de CA que las CCs de las ratas WKY en las fase inicial de la hipertensión arterial esencial, además si esta diferencia puede atribuirse a una mayor liberación del Ca^{2+} proveniente del RE en las CCs de las ratas SHR en comparación con las ratas WKY.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Determinar si hay una mayor liberación basal de CA en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY.
- b) Determinar si la liberación de CA estimulada por una despolarización con alto K^+ (60 mM) es mayor en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY.
- c) Estudiar si una liberación masiva y/o el vaciamiento de Ca^{2+} del RE por estimulación con cafeína es más efectiva para producir la liberación de CA en las CCs de ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY.
- d) Estudiar si el bloqueo previo de la salida de Ca^{2+} del RE por incubación con Ry 10 μM (concentración a la cual antagoniza a los RyR en el RE) disminuye la hipersecreción de CA de las CCs de ratas SHR, y que la liberación de CA obtenida en las CCs de las ratas hipertensas se asemeje a la de las ratas normotensas WKY.

VI. METODOLOGÍA

1. MODELO ANIMAL (RATAS SHR Y WKY)

Los animales utilizados para este trabajo fueron obtenidos de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Desde el año 2009, la colonia de ratas SHR y WKY fue establecida y ha sido monitoreada por la Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo (Jefa de la Unidad Académica Bioterio) a partir de un grupo reproductor de cada cepa adquiridos a Charles River Laboratories (Wilmington, DE, EUA). Los animales de ambas colonias fueron mantenidos en condiciones estándar a 22°C con periodos de 12 h de luz-oscuridad, recibiendo agua y alimento *ad libitum*; y según lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.

1.1 MONITOREO DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN LAS RATAS SHR Y WKY

Se realizó el monitoreo de la presión arterial (sistólica/diastólica) en ratas macho (7-12 semanas de edad) de ambas cepas mediante la técnica indirecta no invasiva para arteria caudal de roedor con la ayuda de un pletismógrafo (Modelo LE 5002, Panlab Harvard Apparatus) (Fig. 7). Las mediciones se llevaron a cabo entre las 10-14 h en un laboratorio mantenido a una temperatura constante de 22 °C y en el mayor silencio posible para evitar que el ruido pudiera estresar al animal alterando las mediciones.

Para conseguir valores confiables de la presión arterial fue indispensable que se produjera vasodilatación. Para lograrlo de forma homogénea y en poco tiempo, se colocó un colchón térmico a 30 °C por un periodo de 30-35 minutos debajo de la jaula donde se mantuvo a la rata. Posteriormente, el roedor fue pesado en una báscula digital y colocado en un cepo para mantenerla inmóvil. Dicho cepo fue colocado dentro de una cámara térmica (dispositivo incorporado con el pletismógrafo) para evitar la pérdida de calor y vasodilatación dejando la cola del animal libre (Fig. 7). Posteriormente fue colocado el manguito sensor en la cola ubicando la zona con la mejor calidad de señal de pulso indicada en la pantalla del pletismógrafo (Fig. 7). Una vez lograda una señal óptima, una mínima variación en los valores mostrados en la pantalla (± 10 pulsos por minuto) y asegurándose que la rata se encuentra en estado de reposo, se activó el botón del dispositivo para obtener los valores de la presión sistólica y diastólica (en mm de Hg) y la frecuencia cardíaca (en latidos por min).

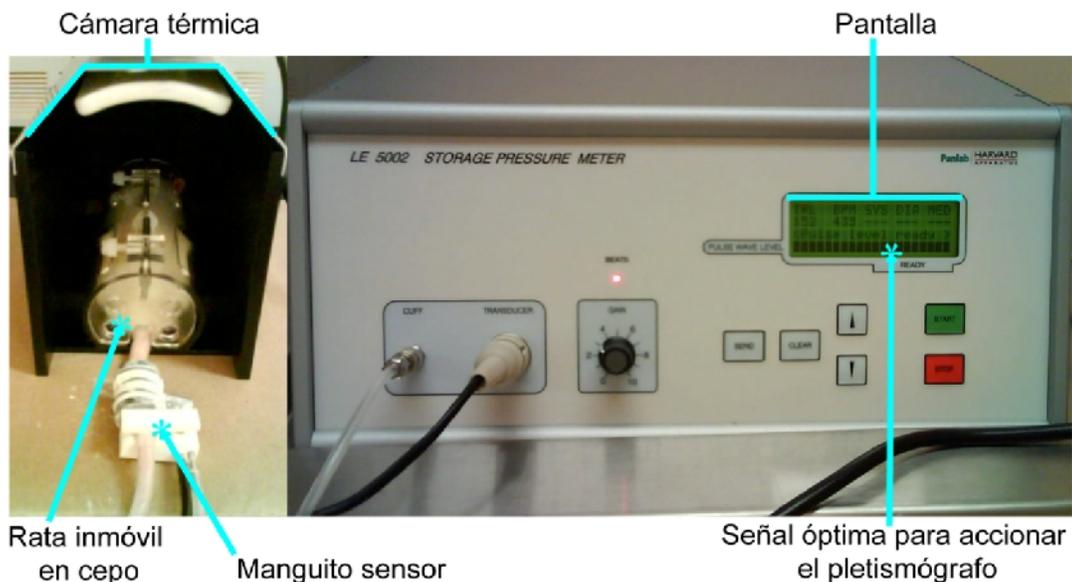


Figura 7. Monitoreo y evaluación de la presión arterial. Del lado izquierdo, se observa el cepo dentro de la cámara térmica con una rata inmóvil; en la parte inferior, el manguito sensor colocado en la parte media de la cola del animal. Del lado derecho, se ubica el pletismógrafo. En la pantalla se indica la señal óptima para realizar la medición y los valores de presión arterial.

Los valores de presión arterial de cada rata fueron evaluados una vez al día durante los 3 días previos a su uso. Los valores obtenidos se promediaron y se muestran en la sección de Resultados (Tabla 1). Se consideraron como ratas hipertensas para experimentación los animales que presentaron valores de presión sistólica ≥ 140 mm Hg.

2. PREPARACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS CROMAFINES ADRENALES

2.1 OBTENCIÓN DE CULTIVO CELULAR

Los cultivos de CCs fueron preparados a partir de la obtención de glándulas adrenales de ratas macho SHR y WKY de 7-12 semanas de edad. Para ello, las ratas se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (75 mg/Kg)/xilacina (5 mg/Kg) y fueron sacrificadas por decapitación con el fin de desangrar al animal. Inmediatamente después, se extrajeron las glándulas adrenales y se colocaron en una solución salina con buffer de bicarbonatos (BBS) con la siguiente composición en mM: 140 de NaCl, 2 de KCl, 0.1 de CaCl_2 , 5 de MgCl_2 , 26 de NaHCO_3 y 10 de Glucosa, con un burbujeo constante con una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2 . Las glándulas adrenales se colocaron bajo un microscopio estereoscópico con el fin de eliminar el tejido adiposo circundante. Se preparó una mezcla de 3% de agarosa diluida en BBS a 32-35°C la cual fue vertida en una placa de cultivo de 4 pozos sirviendo como molde. Cada glándula fue embebida en un pozo

con la finalidad de obtener un bloque por glándula. Para acelerar la solidificación del gel, la placa se refrigeró durante 3 min. Los pozos fueron desmoldados, recortados en forma rectangular (0.5 X 1 cm) y pegados con cianocrilato en la placa de un Vibratomo (Leica VT-1000S) para obtener rebanadas de 350-400 μm de grosor. Las rebanadas obtenidas de glándulas adrenales fueron colocadas en solución BBS burbujeada con O_2 95% y CO_2 5% a 4-6°C para proceder a la siguiente etapa.

Existen diversas técnicas para realizar cultivos de células cromafines (Domínguez *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2008) en las cuales nos basamos realizando algunas modificaciones para lo cual se contó con la ayuda de la Biól. Diana Millán Aldaco. Cada rebanada fue colocada bajo el microscopio estereoscópico con el fin de diseccionar la corteza adrenal de la médula con la ayuda de un bisturí. En condiciones estériles, las médulas adrenales fueron colectadas en un tubo para efectuar la digestión enzimática mediante 1 mg/ml de Colagenasa tipo I (Worthington Inc. Lakewood, NJ, EUA) y 1.5 mg/ml de DNAasa en 3-4 ml de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; Life Technologies Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). Previamente se adicionó al medio HBSS 7.5% de Albúmina Sérica Bovina y 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies, Invitrogen™ y Gibco®, CA, EUA). Con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril se disgregó mecánicamente el tejido medular mediante una suave secuencia de aspiración y eyección durante unos minutos.

El tubo con la porción medular fue colocado en un agitador con baño durante 45-60 min. a 37°C. Transcurrido este tiempo, se observó una apariencia turbia de la solución en el tubo (señal de que la digestión enzimática se efectuó adecuadamente) y se agregó 5 ml de HBSS a 4°C para detener el proceso enzimático. El tubo se centrifugó por 10 min a 1000 rpm, el sobrenadante resultante se retiró y las células fueron re-suspendidas en 3-4 ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, Gibco®, CA, EUA) previamente complementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Life Technologies, Gibco®, CA, EUA) y antibiótico. Nuevamente se centrifugó y se re-suspendió con 1 ml de DMEM hasta obtener un "pellet" final de células.

Se tomaron 50 μl del pellet de células re-suspendido en DMEM para colocarse en placas de cultivo estériles de 12 pozos. Previamente al fondo de cada pozo se colocó un cubreobjetos de vidrio de 35 mm de diámetro tratado con 0.1 mg/ml de Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) durante 24 h a 4°C, eliminando el exceso de Poli-L-lisina con recambios de agua bidestilada antes de su uso. Por último, se permitió que las células se adhirieran a los cubreobjetos durante 30 min y se adicionó 1 ml de DMEM a cada pozo. La placa se colocó en una incubadora en una atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2 a 37 °C. Para los experimentos se utilizaron CCs de 24-48 h posteriores a su cultivo.

3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS

3.1 TÉCNICA DE AMPEROMETRÍA

La amperometría se basa en la detección electroquímica de productos secretados que pueden oxidarse ó reducirse, lo cual permite estudiar la exocitosis de estos compuestos en células aisladas ó en rebanadas de tejido. Los trabajos pioneros del grupo de Wightman en las CCs (Leszczyszyn *et al.*, 1978; Wightman *et al.*, 1991) así como el desarrollo de microelectrodos de fibra de carbono (Gonon *et al.*, 1978; Ponchon *et al.*, 1979) han permitido cuantificar directamente productos de la exocitosis de los gránulos de secreción en neuronas y diversas células secretoras.

La amperometría es un método no invasivo, ya que las células no se someten a diálisis de los componentes citosólicos y los productos liberados son directamente monitoreados. Además esta técnica tiene una excelente resolución temporal que permite seguir la dinámica de la secreción en tiempo real al nivel de gránulos secretores individuales (Angleson & Betz, 1997; Machado *et al.*, 2008). Entre los productos secretados que pueden ser oxidados se encuentran principalmente las monoaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina y serotonina) (Chow & von Rüden, 1995).

La detección de los productos secretados requiere de un detector apropiado, es decir, un electrodo polarizable que funcione como aceptor de electrones. El material típicamente usado es el carbono, ya que tiene las propiedades electroquímicas más estables. Cuando las moléculas oxidables hacen contacto con la superficie del electrodo, los electrones fluyen y son transferidos produciendo un flujo de corriente de oxidación (espiga). El potencial redox es el potencial referido al elemento de hidrógeno estándar donde la mitad de las moléculas están en el estado oxidado y la otra mitad en un estado reducido, por lo tanto en equilibrio (Fig. 8). Para favorecer la conversión de todas las moléculas a la forma oxidada se debe de aplicar un voltaje que exceda el potencial redox del compuesto al menos en 200 mV para aumentar la velocidad de oxidación (Ver Sección 3.2). Para la noradrenalina y adrenalina el máximo del potencial de oxidación es de +600 mV a un pH 7.25. Por cada molécula de adrenalina ó noradrenalina oxidada se producen la pérdida de dos protones y dos electrones (Fig. 8). La corriente generada por la oxidación tras la liberación del contenido de cada gránulo de secreción en las CCs por el electrodo de registro genera una espiga amperométrica (Fig. 10B) que provee información acerca de la cantidad de moléculas oxidadas por la superficie del electrodo.

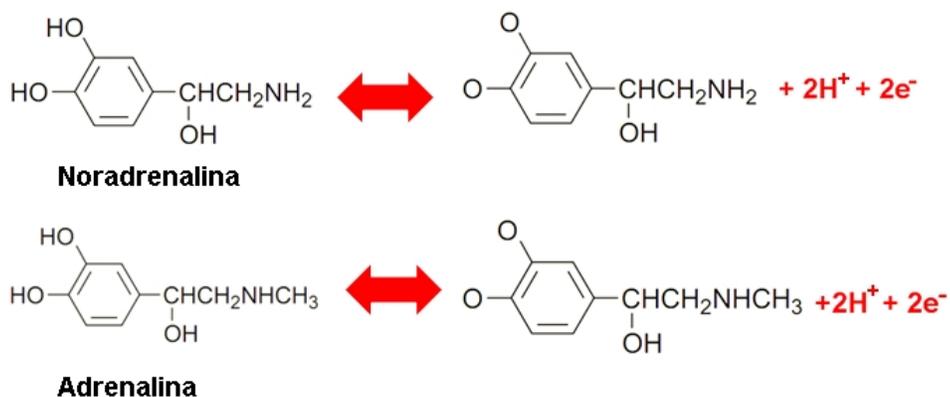


Figura 8. Oxidación de noradrenalina y adrenalina. Para ambas moléculas el anillo bencénico tiene dos grupo hidroxilo (-OH) que al oxidarse se producen 2 protones (H^+) y 2 electrones (e^-).

3.2 ELABORACIÓN DE MICROELECTRODOS DE FIBRA DE CARBONO

La elaboración de los microelectrodos para la técnica de amperometría en nuestro laboratorio fue realizado por el Dr. Pedro Segura Chama, tras instruirse en dicha técnica durante su permanencia en el laboratorio del Dr. Luis Miguel Gutiérrez Pérez en el Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández, España. También existen varios trabajos en donde se describe la elaboración de éstos (Chow & von Rüden, 1995; Bruns, 2004) en los cuales nos basamos.

La fibra de carbono utilizada para la elaboración de los microelectrodos fue de 10 μm de diámetro, cortándose en fragmentos de 4-5 cm de longitud. La fibra fue canulada en una punta de polipropileno para micropipeta. Se rellenó la punta de polipropileno con metanol con el fin de reducir la atracción estática entre la fibra de carbono y el polipropileno, permitiendo que la fibra se desplace a lo largo del tubo evitando su fractura. El extremo puntiagudo se colocó dentro de una resistencia circular que emitía calor hasta que el polipropileno se ablandara. Enseguida se aplicó tracción en dirección contraria a la punta y el cuerpo del tubo de polipropileno hasta alargarlo. Así, la fibra de carbono quedó recubierta y fijada a la punta de polipropileno. (Fig. 9A). Bajo un microscopio estereoscópico y con la ayuda de un bisturí se cortó unos pocos milímetros el final de la punta estirada eliminando el material sobrante entre la fibra de carbono y la punta de polipropileno. Posteriormente, se visualizó bajo el microscopio el final de la delgada punta acercándose a la resistencia hasta que el calor retrajera el polipropileno dejando 0.5-1 mm aproximadamente de longitud de la fibra de carbono expuesta ó libre (Fig. 9A). En la Fig. 9B se muestra un microelectrodo de registro finalizado.

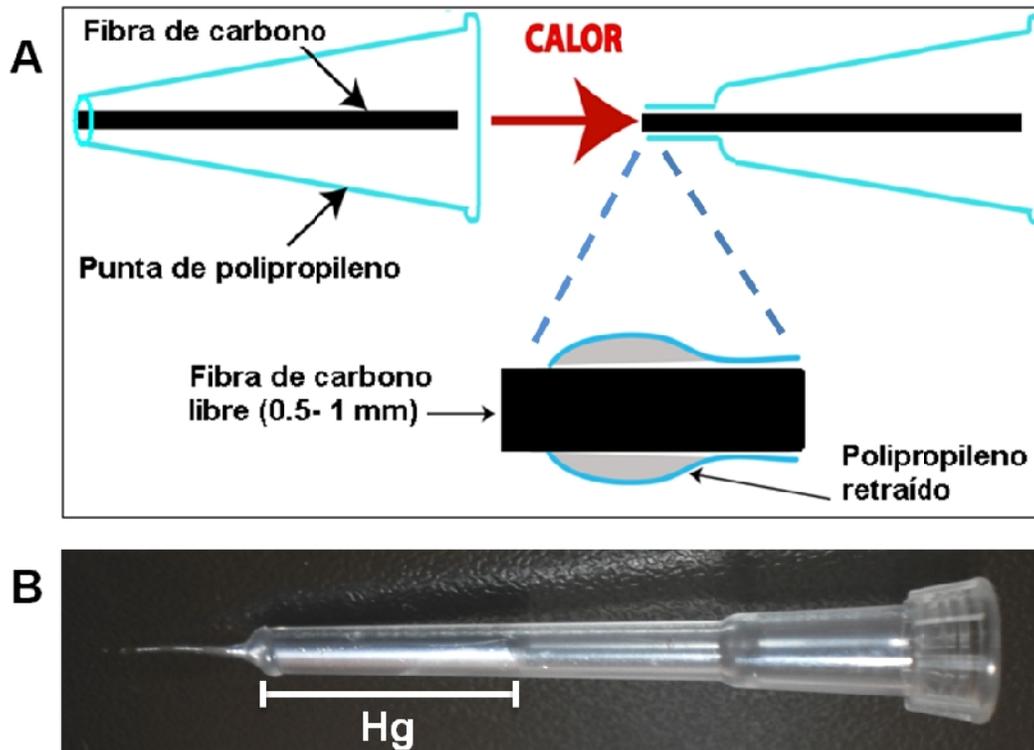


Figura 9. Elaboración de microelectrodos de fibra de carbono para amperometría. En A se esquematiza la fibra de carbono canulada a la punta de polipropileno. Una vez aplicado calor, se estira la punta de polipropileno ajustando la fibra de carbono. Las líneas punteadas esquematizan un acercamiento de la punta indicando la parte de la fibra de carbono expuesta/libre. En B se muestra un microelectrodo finalizado con mercurio en su extremo anterior.

Para permitir el cierre del circuito durante los registros amperométricos, se rellenó el final de la punta de polipropileno con mercurio (Fig. 9B). El mercurio quedará en contacto con el alambre de plata clorada una vez insertado en el cabezal del amplificador para dar continuidad eléctrica. La parte de la fibra de carbono expuesta es la que hará contacto con la membrana de la célula cromafin durante los registros (Fig. 10A).

3.3 REGISTROS AMPEROMÉTRICOS

Se colocó un cubre objetos con CCs en cultivo al fondo de una cámara de registro ubicada en la platina de un microscopio invertido (Eclipse FNI, Nikon, Tokio, Japón). La imagen se capturó con una videocámara CCD conectada al microscopio y enviada a un monitor para ser visualizada. Las células fueron observadas con un objetivo de 40x y se mantuvieron con una perfusión constante de 1.5 ml/min de solución Ringer Krebs-HEPES con la siguiente composición en mM:

135 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 Glucosa y 15 HEPES ajustando a pH 7.3 con NaOH. El volumen que se procuró mantener en la cámara de registro fue de 0.5 ml.

Una vez que se eligió una célula a registrar (célula cromafin de forma redonda y con citoplasma claro visualizada bajo el microscopio de contraste de fase) el microelectrodo de fibra de carbono ajustado al cabezal del amplificador se acercó hacia la célula con la ayuda de un micromanipulador (Sutter MPC-200, Sutter Instruments) hasta hacer contacto estrecho con la membrana celular (Fig. 10A). El potencial del electrodo de registro se mantuvo a un valor fijo de voltaje de +700 mV durante el registro y los datos se adquirieron a una frecuencia de 4 kHz. Esto aseguró que las CA liberadas entre la punta de la fibra de carbono del microelectrodo de registro y el área de contacto con la membrana celular de la célula cromafin fueran oxidadas, detectadas y cuantificadas (Fig. 10A). Las corrientes amperométricas fueron registradas mediante un amplificador modelo HEKA EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Alemania) y capturadas por software de adquisición de datos PatchMaster (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Alemania) en una computadora Apple Machintosh G4.

Con el fin de estandarizar la oxidación y cuantificación de CA por los electrodos de registro, los electrodos fabricados fueron calibrados mediante la aplicación de un pulso de 50 μ M de adrenalina (Machado *et al.*, 2008) previo a su uso. Los electrodos que generaran una corriente menor a 200 pA al contacto con la adrenalina fueron descartados.

Para abordar los objetivos planteados en este proyecto se siguieron las estrategias experimentales descritas a continuación:

- a) Cada corrida experimental tuvo una duración total de 240 s (4 min) con perfusión continua de solución Ringer Krebs-HEPES. Durante los primeros 120 s se registró un periodo de actividad basal (es decir, la liberación de CA de manera espontánea) de la célula cromafin evaluada, ya sea de la cepa WKY o SHR.
- b) Con el fin de evaluar la liberación de CA en las CCs provenientes de ambas cepas por una despolarización de la célula, se aplicó un pulso de K⁺ 60 mM durante 5 s, registrándose la respuesta producida los siguientes 120 s. Dicha solución pasó a través de tubo de polietileno de 0.5 mm de calibre (sujetada a una punta de polietileno para micropipeta que le dio soporte) colocada a una distancia de 40 μ m aproximadamente de la célula cromafin a registrar con la ayuda de un segundo micromanipulador. La solución de alto K⁺ se aplicó por gravedad mediante la apertura de un canal de una serie de válvulas electromecánicas (Modelo ALA-VM4, ALA Scientific Instruments, Inc). La solución de alto K⁺ tuvo la siguiente composición en

mM: 80 NaCl, 59 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 Glucosa y 15 HEPES, ajustada a un pH 7.3 con KOH.

- c) Con el fin de evaluar la liberación de CA en las CCs provenientes de las dos cepas tras vaciamiento ó liberación masiva del Ca²⁺ del RE, una vez transcurrido el periodo inicial del registro de 120 s, se aplicó un pulso de 10 mM de Cafeína durante 10 s, registrándose el efecto los siguientes 120 s. Dicha solución se aplicó por gravedad usando el mismo sistema descrito anteriormente accionando otra válvula electromecánica independiente. La cafeína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) fue disuelta en Ringer Krebs-HEPES a una concentración final de 10 mM. Tras su preparación se reajustó el pH a 7.3 con KOH en caso necesario.
- d) Por último y con el fin de evaluar el efecto del bloqueo específico de la salida de Ca²⁺ del RE a través de los receptores de Rianodina (RyR) se empleó este alcaloide (Rianodina, Ry) a una concentración de 10 µM (concentración a la cual antagoniza a los RyR en el RE). Se registró la liberación de CA de las CCs provenientes de las dos cepas, comparándose la respuesta inicial de una despolarización con alto K⁺ (siguiendo los mismos pasos descritos en los incisos A y B) seguido de 10 min. de incubación con 10 µM de Ry. Transcurrido este periodo y aún en presencia de Ry se produjo una segunda despolarización con alto K⁺. Las respuestas secretoras de la misma célula fue comparada antes y después de Ry. Estos experimentos se realizaron en CCs de ambas cepas. La Ry (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, EUA) se alicuotó usando como vehículo etanol al 96%. Justo antes de utilizarse en los experimentos se disolvió en Ringer Krebs-HEPES para alcanzar la concentración final mencionada.

3.4 ANÁLISIS DE LAS ESPIGAS AMPEROMÉTRICAS

Las espigas amperométricas registradas en CCs de cada grupo experimental fueron capturadas por el software PatchMaster en formato binario para ser analizados con la rutina macro Quanta Analysis 8.2 escrita para el programa Igor Pro 5.0 (Wave Metrics, Lake Oswego, OR). Existen trabajos donde se explican con gran detalle (Segura *et al.*, 2000, Mosharov & Sulzer, 2005, Borges *et al.*, 2008) los algoritmos utilizados para la adquisición, detección y análisis de los eventos amperométricos. Para fines de este estudio, se describen los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas considerados para nuestros experimentos (Fig. 10C y 10D):

- a) En la Fig. 10C se muestra la detección de la línea basal del registro para detectar el umbral de las espigas (*i* = inicio; *e* =final). Esta se determinó colocando dos cursores en un espacio del registro libre de espigas. Se consideran 2 desviaciones estándar del ruido basal como el umbral para ser considerada como espiga.

- b) Se calculó el número de moléculas que han sido oxidadas al integrar la corriente transitoria de las espigas amperométricas obtenidas (**Q**) (Fig. 10C). Se obtuvo el valor de la carga (**Q**) de cada espiga (de acuerdo a la Ley de Faraday) que está directamente relacionada con el número de moléculas electrolizadas de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Q = \int I dt = \frac{zFM}{N_A} = z e M$$

Donde **z** equivale al número de moles de electrones transferidos por mol de la sustancia reactiva (catecolaminas= 2 electrones por molécula), **F** es la Constante de Faraday (96.485 C/mol), **M** representa el número de moléculas oxidadas ó reducidas, **N_A** es el número de Avogadro (6.023 x 10²³ mol) y **e** la carga elemental del electrón (1.602 x 10⁻¹⁹ C).

- c) La amplitud máxima de la espiga (**I_{max}**) corresponde a la intensidad de corriente máxima generada por una determinada concentración de moléculas que se oxidan al contacto con la superficie del electrodo (Fig. 10C). Mosharov & Sulzer, 2005 recomienda tomar espigas bien definidas y las cuales resultan fáciles de analizar mayores a 5 pA.
- d) La duración media (**t_{1/2}**) corresponde al tiempo transcurrido al 50% de la amplitud máxima alcanzada (Fig. 10C) e indican el tiempo que tarda en liberarse las CA a través del poro de fusión. Mosharov & Sulzer, 2005 recomiendan analizar espigas bien definidas y fáciles de analizar entre los valores de 2 ms-30 ms.
- e) En algunas ocasiones, la espiga amperométrica se encuentra precedida de una pequeña corriente ("pie" de la espiga (**F**), "foot" en inglés) que representa una "fuga" ó liberación anticipada de moléculas durante el comienzo de la formación del poro de fusión. Posteriormente, el poro se dilata completamente para una excitosis completa del contenido vesicular, formándose la espiga completa (Chow *et. al.*, 1992, Camacho *et al.*, 2003). Mosharov & Sulzer, 2005 reportaron la presencia de este pie en un 30-60% de las espigas amperométricas analizadas en CCs adrenales de rata. Existen varios parámetros que se pueden obtener de este pie (**F**) (Fig.10D), como la carga (**FQ**), la duración (**t**) y la amplitud del pie (**F_{max}**). Sin embargo, para fines de este trabajo solamente nos centramos en evaluar la presencia ó ausencia de este pie en las espigas obtenidas. Cuando se detectó la presencia de un pie, la carga del pie (FQ) de la espiga se sumó a la carga total de la espiga (Q).

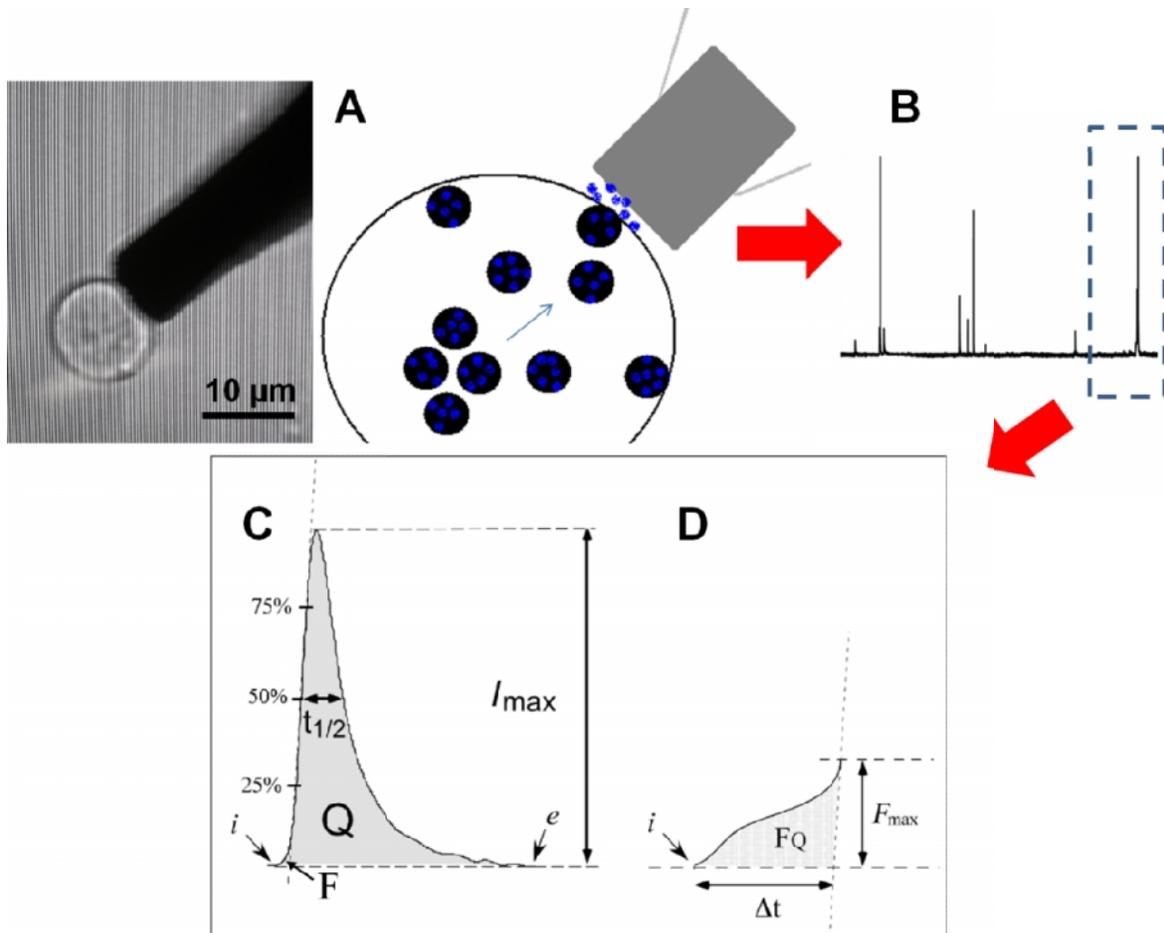


Figura 10. Registro amperométrico y parámetros cinéticos evaluados en las espigas amperométricas. En la A, se muestra la imagen de una fibra de carbono de un microelectrodo haciendo contacto con la membrana de una célula cromafín proveniente de una rata SHR durante un experimento. El electrodo de registro oxida las CA liberadas de los gránulos de secreción (A). La exocitosis de CA de un gránulo secretor genera un trazo rápido y transitorio de corriente, es decir, una espiga amperométrica. En B se observa un fragmento 5 s de un trazo de la actividad espontánea de una célula cromafín SHR. En C y D se indican los parámetros cinéticos medidos para cada espiga (i y e ; inicio y final de la espiga; I_{max} =amplitud máxima; $t_{1/2}$ = duración media; Q= carga; F=pie; FQ=carga del pie; t =duración del pie; F_{max} =amplitud del pie). Figuras C y D fueron tomadas y modificadas de Borges *et al.*, 2008.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La parámetros cinéticos de las espigas amperométricas registrados de las CCs adrenales de las cepas SHR y WKY durante la actividad basal, tras una despolarización con alto K^+ y después de un pufo de cafeína se compararon con una prueba de U de Mann-Whitney. Los parámetros cinéticos de las espigas de ambas cepas tras una despolarización con alto K^+ antes y después de la incubación con Ry se compararon por un ANOVA de una sola vía seguido de una post-prueba de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ fue tomado como límite de significancia.

VII. RESULTADOS

1. VALORES DE LA PRESIÓN ARTERIAL Y FRECUENCIA CARDIACA EN LAS RATAS SHR Y WKY

En la Tabla 1 se comparan los valores promedio de la presión arterial y frecuencia cardiaca de las ratas de las cepas WKY y SHR utilizadas en este trabajo. Los valores obtenidos para las ratas SHR son significativamente mayores a los obtenidos para las ratas WKY. Estos resultados son similares a los previamente reportados por Lee *et al.*, 1991 para las dos cepas en el rango de 7-12 semanas de edad en la fase inicial de la hipertensión arterial esencial (hipertensión fase 1).

Tabla 1. Valores promedio de la presión arterial y frecuencia cardiaca en las ratas WKY y SHR.

Cepa	Sistólica (mm de Hg)	Diastólica (mm de Hg)	Pulsos por Minuto
WKY (n=10)	115 ± 2	80 ± 3	331 ± 11
SHR (n=10)	161 ± 7*	110 ± 5*	410 ± 10*

Cada valor es la media ± ESM, n= número de animales, ***p < 0.05**.

2. LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE CA EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR Y WKY.

El 77% del total de las CCs provenientes de las ratas WKY (n=18 células) y el 94% de las CCs de las ratas SHR (n=18 células) mostraron una liberación espontánea de CA durante el periodo de registro basal (120 s).

En la Fig. 11 se muestran trazos representativos de la liberación espontánea de CA por las CCs para ambas cepas, nótese que las espigas amperométricas registradas en las CCs de la cepa SHR son de una mayor amplitud en comparación con las espigas de las CCs de la cepa WKY.

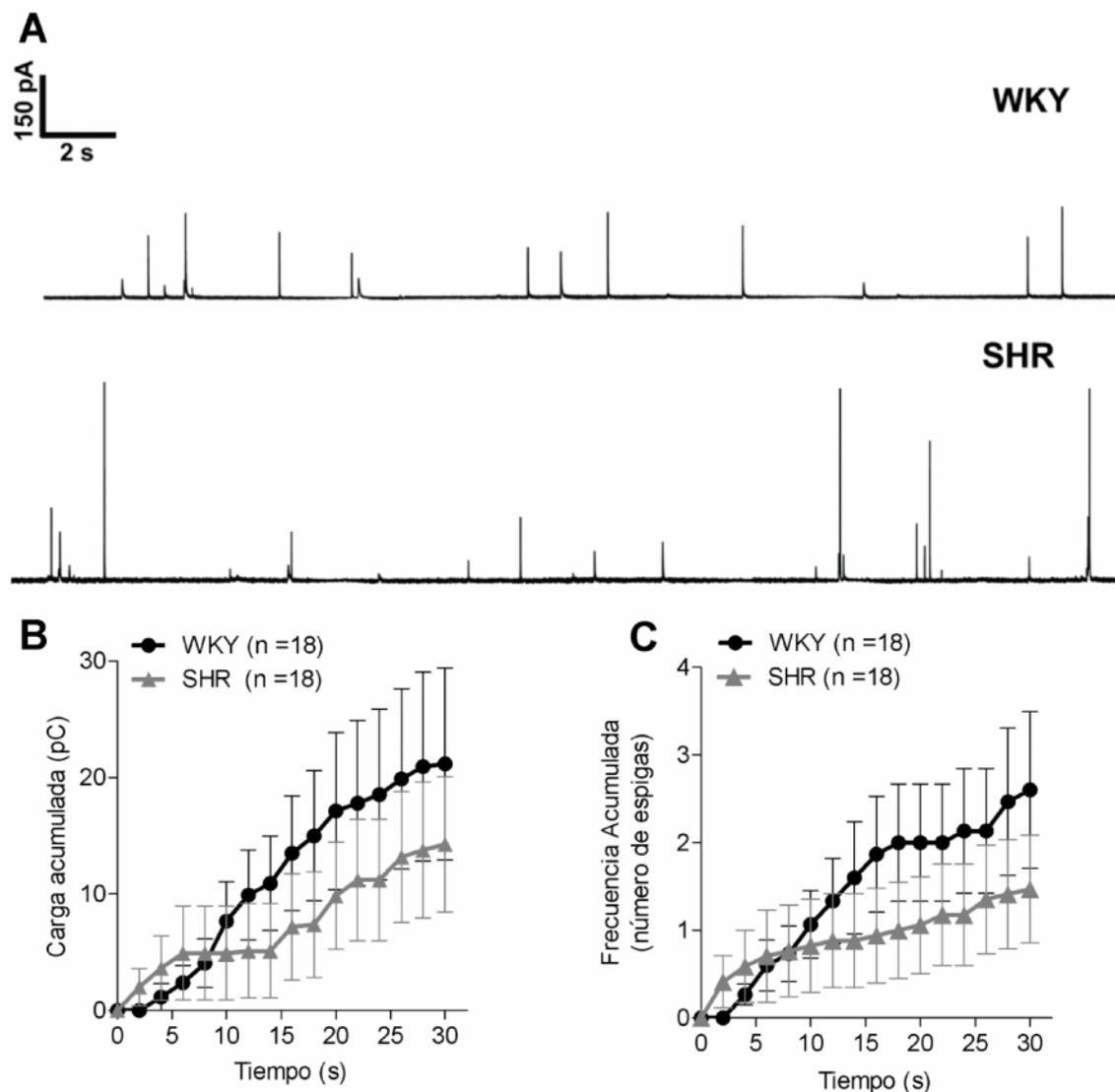


Figura 11. Liberación espontánea de CA en las CCs de las ratas WKY y SHR. (A) Trazos representativos de la liberación espontánea de CA de las CCs de las ratas WKY y SHR. (B) Comparación de la carga acumulada y (C) frecuencia acumulada en función del tiempo de las espigas amperométricas de las CCs provenientes de las ratas SHR y WKY ($p > 0.05$). Cada punto es la media \pm ESM, $n =$ número de células.

Con el fin de comparar cuantitativamente la cantidad de CA liberadas a lo largo del tiempo se obtuvo la carga acumulada (la integral de la corriente en función del tiempo; en pC), y la frecuencia acumulada (número de espigas en función del tiempo) de las espigas amperométricas registradas en las CCs para ambas cepas. En la Fig 11A, se observa que la carga acumulada incrementó de manera gradual alcanzando los valores máximos a los 30 s de 17.1 ± 6.7 pC en las CCs de ratas WKY y 9.8 ± 4.4 pC en las CCs de las ratas SHR. Aunque se observa una mayor liberación de CA de las CCs de las ratas WKY, la diferencia entre ambas cepas no fue

estadísticamente significativa ($p=0.16$). En la Fig 11B, se observa un incremento paulatino en los valores de la frecuencia acumulada alcanzando los valores máximos de 1.4 ± 0.2 espigas en las CCs de las ratas WKY y 0.9 ± 1 espigas en las CCs de las ratas SHR a los 30 s. La diferencia entre ambas cepas no fue estadísticamente significativa ($p=0.06$).

También se evaluaron los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas registradas durante la liberación espontánea de CA de las CCs de las ratas WKY y SHR (Fig. 12 y Tabla 2). Estos parámetros nos permiten comparar la duración de las espigas, es decir, el tiempo que tardan las CA en liberarse de las vesículas cromafines a través del poro de fusión ($t_{1/2}$; en ms), así como la carga promedio de las espigas (Q en pC) es decir, el número de moléculas de CA liberadas por gránulo de secreción y la concentración máxima de CA oxidadas por el electrodo de registro (I_{\max} ; en pA).

En la Fig. 12 se muestra que las espigas amperométricas provenientes de las CCs de las ratas SHR tienen un valor de duración media ($t_{1/2}$) (8.0 ± 0.4 ms) ligeramente menor ($p<0.05$) siendo estadísticamente significativa en comparación con las CCs de las ratas WKY (8.8 ± 0.3 ms). Esta diferencia indica que las CA que se liberan de las vesículas de secreción de las CCs de las ratas SHR ocurre en un menor tiempo en comparación con las CCs de las ratas WKY.

En cambio, los valores de carga promedio (Q) (5.9 ± 0.3 pC en WKY vs 7.3 ± 0.5 pC en SHR) y la amplitud promedio (I_{\max}) (47.7 ± 3.3 pA en WKY vs 71.1 ± 5.7 pA en SHR) de las espigas registradas de las CCs de las ratas SHR son significativamente mayores en comparación con las espigas de la cepa WKY. Estos resultados sugieren que las CCs de las ratas SHR liberan una mayor cantidad de CA por gránulo de secreción en comparación con las CCs de ratas WKY. Los valores promedio de los parámetros cinéticos de las espigas obtenidos en las dos cepas se resumen en la Tabla 2.

Los tamaños de las espigas varían dentro de un mismo registro y entre diferentes células. Para analizar los valores de la amplitud máxima de las espigas (I_{\max}) durante la liberación espontánea de CA en las CCs de las ratas WKY y SHR se realizó un histograma de frecuencias. El número de espigas se normalizó con respecto al número total para cada cepa (ordenadas) tomando intervalos de 20 pA de amplitud (abscisas, Fig. 12). En la Fig. 12 se muestra que la mayoría de las espigas amperométricas se distribuyeron en los rangos de 5-99 pA de amplitud en las CCs de ambas cepas, resultando 86% para la cepa WKY y 75% para la cepa SHR. Entre 100-219 pA de amplitud se distribuyeron 12% y 20% de las espigas para WKY y SHR; mientras que las espigas mayores a 220 pA de amplitud fueron 2% y 5% en WKY y SHR respectivamente. Nuestros datos indican que las espigas amperométricas durante la liberación espontánea de las CCs de SHR son de mayor amplitud respecto a las CCs de WKY.

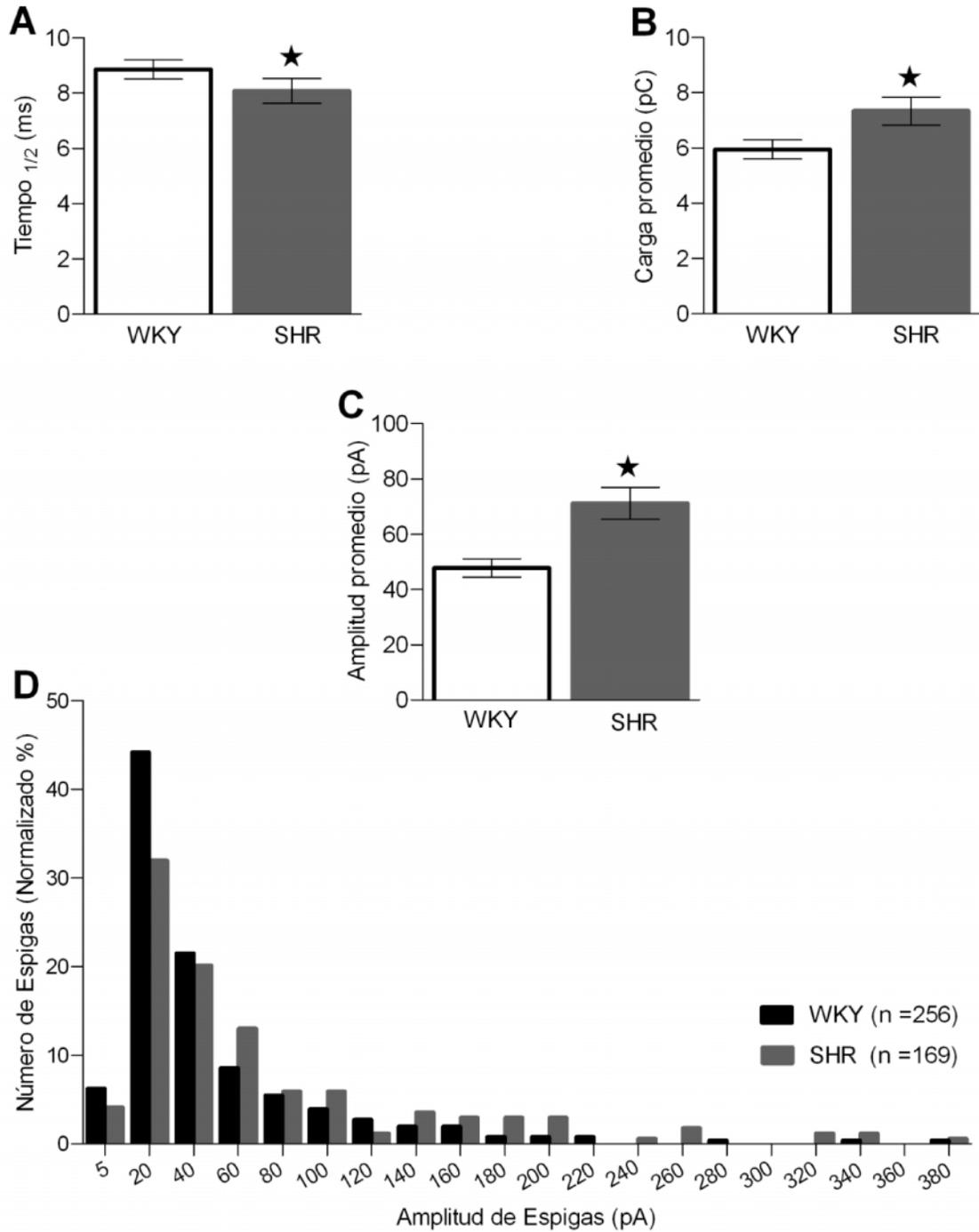


Figura 12. Comparación de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas durante la liberación espontánea de CA de las CCs de ratas WKY y SHR. (A) Tiempo $_{1/2}$, (B) carga promedio (C) amplitud promedio $I_{máx}$ y (D) distribución de la amplitud máxima de las espigas amperométricas registradas en las CCs de ambas cepas. Cada barra representa la media \pm ESM (A, B y C), * $p < 0.05$; y el porcentaje de espigas (D), $n =$ número total de espigas.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de las espigas obtenidas en la liberación espontánea de CA de las CCs de las ratas WKY y SHR.

Cepa	$t_{1/2}$ (ms)	Carga Promedio (pC)	I_{max} (pA)	Número de espigas
WKY	8.8 ± 0.3	5.9 ± 0.3	47.7 ± 3.3	256
SHR	8.0 ± 0.4*	7.3 ± 0.5*	71.1 ± 5.7*	169

Cada valor es la media ± ESM, * $p < 0.05$; n= 18 células para cada cepa.

Se comparó el porcentaje de espigas que presentaron un “pie” durante la liberación espontánea de CA en las CCs de las ratas WKY y SHR. Nuestros resultados muestran una mayor frecuencia en la presencia de un “pie” de las espigas obtenidas de las CCs de las ratas SHR (75.3 ± 6.8%) en comparación con las ratas WKY (57.1 ± 7.3%). No obstante, para la muestra obtenida esta diferencia no resultó significativa ($p=0.053$). Es posible que un aumento en el tamaño de muestra nos permita confirmar si existe una diferencia referente al mayor porcentaje de espigas con pie en las CCs de las ratas SHR vs WKY.

3. LIBERACIÓN DE CA TRAS UNA DESPOLARIZACIÓN CON ALTO K^+ EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR Y WKY.

Con el fin de evaluar la liberación de CA en las CCs provenientes de ambas cepas después de una despolarización de la célula (permitiendo la entrada de Ca^{2+} por la activación de los CCDV) una vez finalizado el periodo de registro basal (120 s) se aplicó un pulso de K^+ 60 mM durante 5 s y se registró la respuesta obtenida los siguientes 120 s.

En la Fig. 13 se muestran trazos representativos de las espigas amperométricas generadas en las CCs para ambas cepas tras la aplicación de un pulso de alto K^+ (5 s). Después de un pulso de alto K^+ , la liberación de CA se incrementó de manera inmediata durante los primeros 10 s en las CCs de ambas cepas; la respuesta secretora fue mayor en las CCs de las ratas SHR. La carga acumulada máxima de las espigas en función del tiempo tras la aplicación de un pulso de alto K^+ fue es ~2 veces mayor ($p < 0.05$) a los 30 s en las CCs de la cepa SHR en comparación con la cepa WKY (169.9 ± 23.1 pC vs 80.2 ± 11.7 pC, respectivamente, Fig 13). En esta gráfica se observa que los valores de carga acumulada tras la aplicación de un pulso de alto K^+ se incrementaron abruptamente durante los primeros 10-15 s. Además, la frecuencia acumulada máxima alcanzada a los 30 s fue mayor ($p < 0.05$) en las CCs de las ratas SHR (18 ± 2 espigas) en comparación con las ratas WKY (12 ± 1.3 espigas).

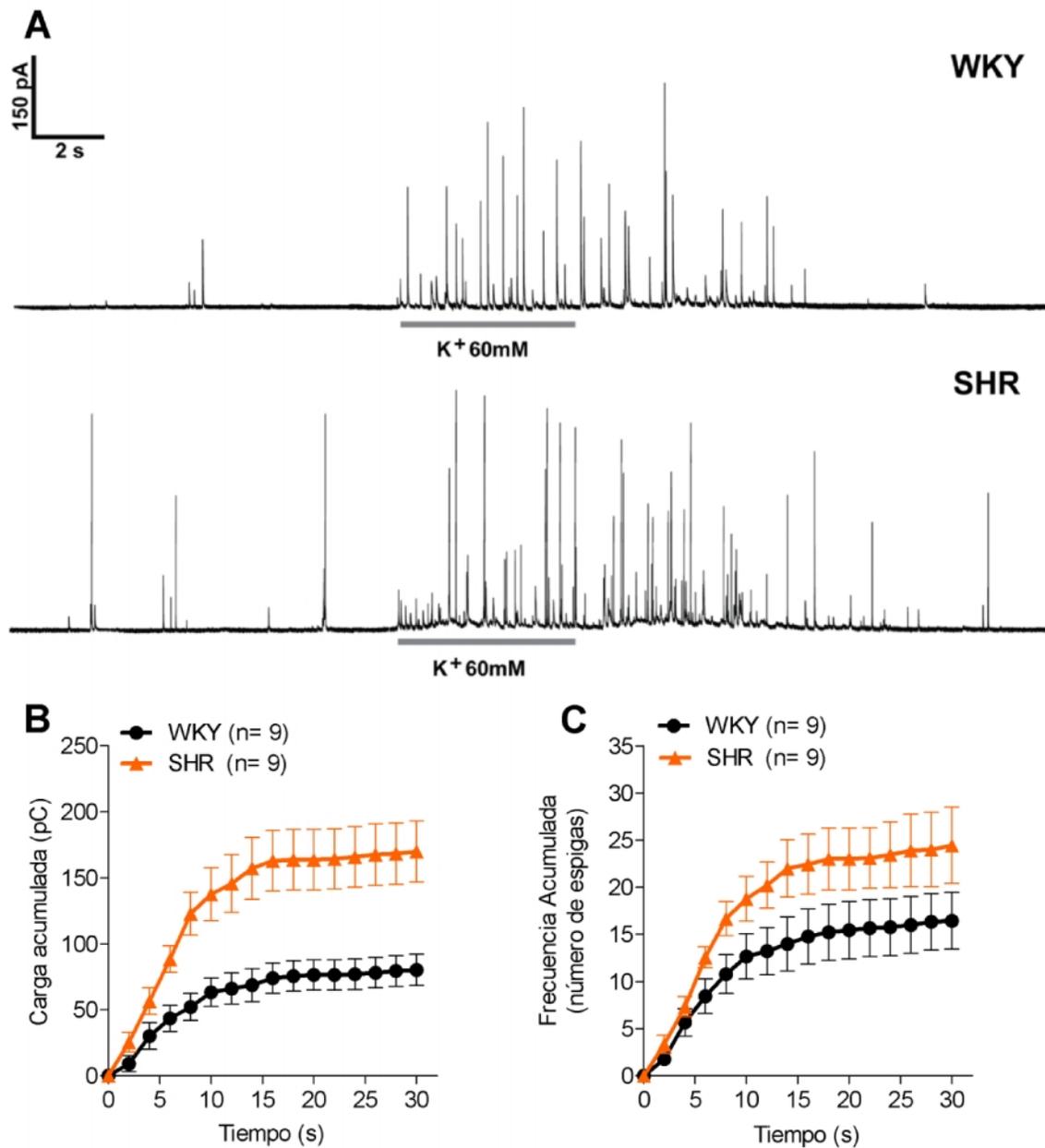


Figura 13. Liberación de CA en las CCs de las ratas WKY y SHR después de la aplicación de un pulso con alto K⁺ (60 mM, 5 s). (A) Trazos representativos de la liberación de CA tras la aplicación de un pulso de K⁺ 60 mM (5 s) en las CCs de las ratas WKY (registro superior) y SHR (registro inferior). (B) Comparación de la carga acumulada y (C) la frecuencia acumulada en función del tiempo de las espigas amperométricas tras un pulso de K⁺ 60 mM de las CCs para ambas cepas ($p < 0.05$). Cada punto representa la media \pm ESM; n= número de células. Tiempo 0= inicio del pulso de con alto K⁺.

En la Fig. 14, se observa que el valor promedio de $t_{1/2}$ fue significativamente menor ($p < 0.05$) para las espigas de SHR (7.8 ± 0.3 ms) que para las CCs de WKY (10.1 ± 0.3 ms). Estos datos

sugieren nuevamente que la liberación de las CA de los gránulos de secreción se lleva a cabo en menor tiempo en las CCs de las ratas SHR. En cambio, los valores de carga promedio (Q) (4.8 ± 0.2 pC en WKY vs 6.8 ± 0.3 pC en SHR) y la amplitud promedio (I_{max}) (38.9 ± 3.2 pA en WKY vs 60.9 ± 3.4 pC en SHR) fueron significativamente mayores en las CCs de SHR. Por lo tanto, tras una despolarización con alto K^+ , las CCs de las ratas SHR liberan una mayor cantidad de CA (mayores valores de carga y amplitud promedio) por vesícula, siendo esta liberación de CA más rápida (un valor menor de $t_{1/2}$). Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para las espigas amperométricas registradas en ambas cepas se muestran en la Secc. 4, Tabla 3.

En la Fig. 14 se observa la distribución de valores de amplitud máxima (I_{max}) de las espigas generadas después de la aplicación de un pulso con alto K^+ en las CCs de las ratas WKY y SHR. El 87% de las espigas de WKY y 73% de las espigas de SHR se distribuyeron entre los rangos de 5-79 pA. En el rango de 80-219 pA se distribuyeron 11% y 22% de las espigas de WKY y SHR; mientras que solo 2% y 5% de las espigas de WKY y SHR respectivamente fueron mayores de 220 pA de amplitud. Estos resultados son consistentes con un mayor valor de amplitud promedio obtenido en las espigas amperométricas de las CCs de las ratas SHR vs WKY. Además, sugieren que dentro de la población del total de gránulos de secreción provenientes de las CCs de las ratas SHR existe una sub población de gránulos con mayor contenido de CA, la cual parece estar ausente en las CCs de las ratas WKY.

Los resultados obtenidos hasta este punto sugieren que después una despolarización con alto K^+ las CCs de las ratas SHR liberan una mayor cantidad de CA en comparación con las CCs de las ratas normotensas WKY. Estos resultados se asemejan a los datos reportados por Miranda-Ferreira *et al*, 2008 donde señalan una mayor secreción de CA en las CCs de ratas SHR en comparación con las ratas normotensas Sprague-Dawley en etapas de hipertensión arterial avanzada. Una diferencia importante entre nuestro trabajo y el estudio de Miranda-Ferreira *et al*, 2008, es que nosotros utilizamos la cepa control normotensa adecuada, es decir las ratas WKY. Además, en nuestro estudio examinamos la liberación de CA en las CCs en etapas iniciales de la hipertensión arterial (ratas de 7-12 semanas de edad) lo cual no fue estudiado por Miranda-Ferreira *et al*, 2008 hasta ahora.

Finalmente, tras la aplicación de un pulso con alto K^+ , el porcentaje de espigas con pie fue ligeramente mayor ($70.8 \pm 4\%$) en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de ratas WKY ($65.4 \pm 3.7\%$), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.60$).

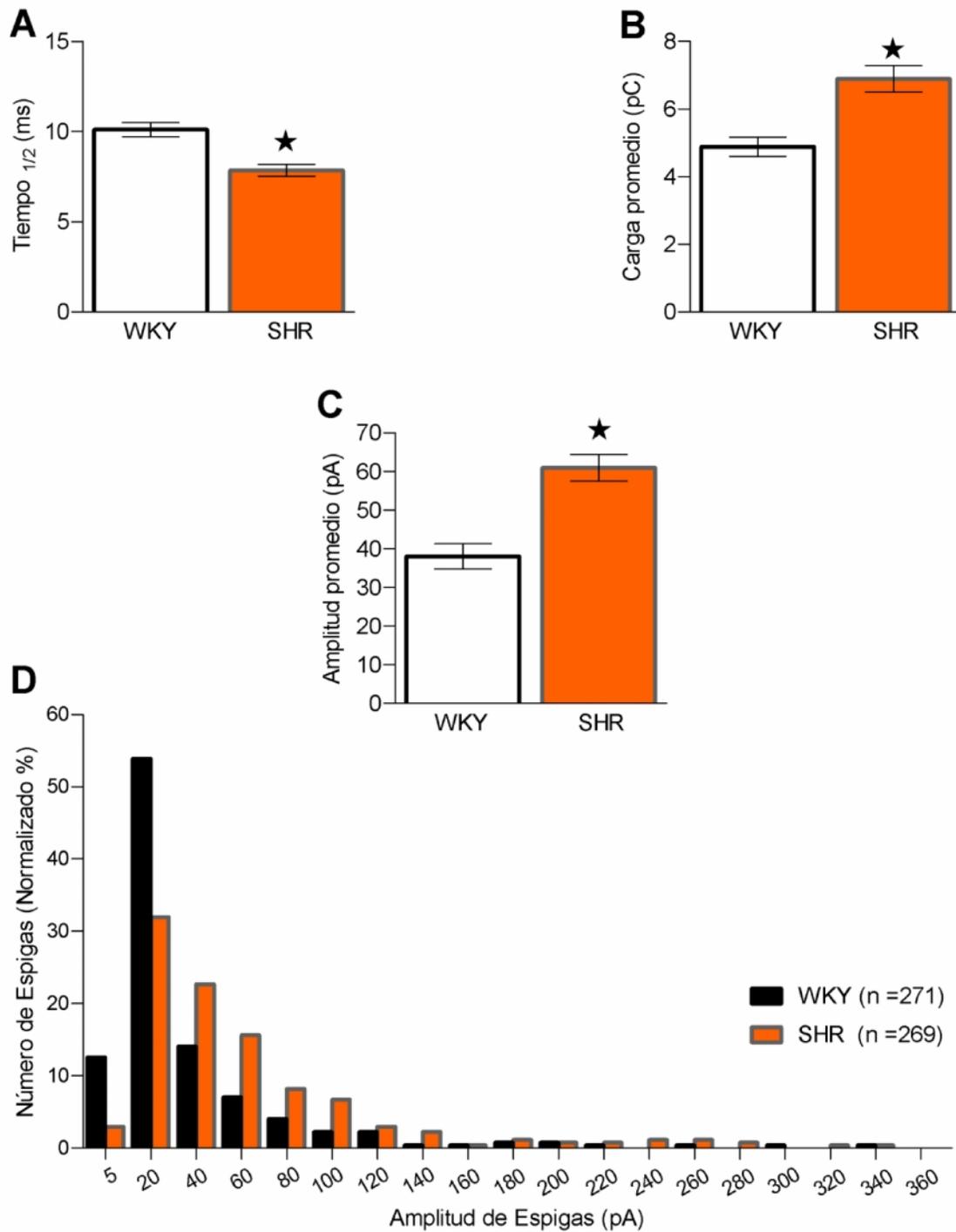


Figura 14. Comparación de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en las CCs de ratas WKY y SHR después de la aplicación de un pulso con alto K^+ . (A) Tiempo $_{1/2}$, (B) carga promedio, (C) amplitud promedio $I_{m\acute{a}x}$ y (D) distribución de la amplitud máxima de las espigas amperométricas registradas en las CCs para ambas cepas. Cada barra representa la media \pm ESM (A, B y C), * $p < 0.001$; y el porcentaje de espigas (D), $n =$ número total de espigas.

4. LIBERACIÓN DE CA INDUCIDA POR EL VACIAMIENTO DE LAS POZAS INTRACELULARES DE Ca^{2+} DEL RE POR CAFEÍNA EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR Y WKY.

Con el fin de examinar si existe una contribución diferencial del Ca^{2+} proveniente de las pozas intracelulares de Ca^{2+} del RE en la liberación de CA en las CCs en las ratas SHR y WKY una vez finalizado el periodo de registro basal (120 s) se aplicó un pulso de cafeína 10 mM durante 10 s y se registró la respuesta obtenida durante los siguientes 120 s.

En la Fig. 15, se muestran los trazos representativos de las espigas amperométricas registradas de las CCs de ambas cepas tras la aplicación de un pulso de cafeína (10 mM; 10 s). Tras la aplicación de un pulso de cafeína, la liberación de CA se produjo con un retraso de 2-3 s, siendo este retraso similar para ambas cepas. Posteriormente, se observó una ráfaga de espigas amperométricas en un periodo muy breve (~5 s) junto con la elevación de la línea basal (posiblemente debido a la rápida liberación de CA de manera simultánea). A pesar de la presencia de cafeína en la solución extracelular, no se obtuvieron más espigas amperométricas tras este periodo de ~5 s. La liberación de CA inducida por la aplicación de cafeína fue mayor en las CCs de las ratas SHR que en las CCs de las ratas WKY.

Los valores de la carga acumulada de las espigas generadas a lo largo del tiempo después de la aplicación de un pulso de cafeína para ambas cepas (Fig.15) incrementaron lentamente durante los primeros 5-6 s después de la aplicación de cafeína en ambas cepas (lo cual concuerda con la latencia observada de ~2-3 s antes del inicio de la secreción). Después de estos segundos iniciales, se observó un rápido incremento en los valores de carga acumulada para ambas cepas. El valor máximo alcanzado a los 30 s fue ~2 veces mayor en las CCs de la cepa SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY (202.4 ± 28.1 pC vs 101.8 ± 14.5 pC, respectivamente) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Además, la frecuencia acumulada máxima alcanzada a los 30 s fue mayor ($p < 0.05$) en las CCs de las ratas SHR (15 ± 1.5 espigas) en comparación con las ratas WKY (7.5 ± 0.8 espigas).

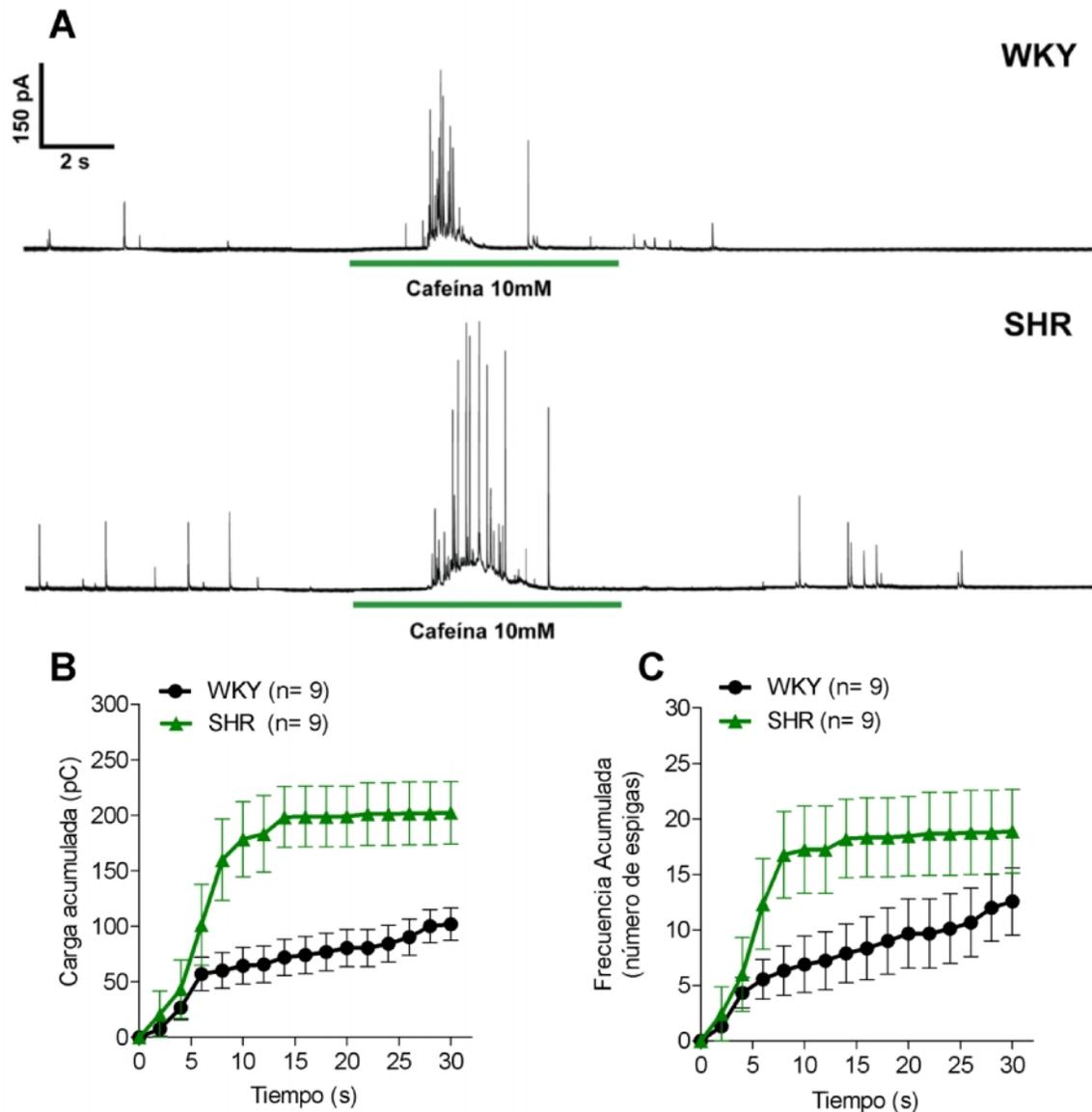


Figura 15. Liberación de CA en CCs de ratas WKY y SHR después de la aplicación de un pulso de cafeína (10 mM, 10 s) (A) Trazos representativos de la liberación de CA tras la aplicación de un pulso de cafeína en las CCs de las ratas WKY y SHR. (B) Comparación de la carga acumulada y (C) frecuencia acumulada en función del tiempo de las espigas amperométricas producidas por las CCs de ambas cepas en respuesta al pulso de cafeína ($p < 0.05$). Cada punto representa la media \pm ESM; n= número de células. Tiempo 0= inicio del pulso de cafeína.

En la Fig. 16, el valor promedio de $t_{1/2}$ fue significativamente menor ($p < 0.05$) para las espigas de las CCs de las cepa SHR (8.2 ± 0.3 ms) en comparación con las cepa WKY (10.6 ± 0.5 ms). En cambio, los valores de carga promedio (Q) (7.2 ± 0.4 pC en WKY vs 9.9 ± 0.6 pC en SHR) y la amplitud promedio (I_{max}) (58.8 ± 5.2 pA en WKY vs 88.6 ± 5.6 pA en SHR) fueron significativamente mayores para las espigas de CCs de SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY. Por lo

tanto, las CCs de las ratas SHR tras un pulso de cafeína, liberan gránulos de secreción con una mayor cantidad de CA (mayores valores de carga y amplitud promedio) en menor tiempo ($t_{1/2}$) en comparación con las ratas WKY.

Al comparar la distribución de los valores de la amplitud máxima (I_{max}) de las espigas generadas por un pulso de cafeína en las CCs de ambas cepas, se observó que el 76% y 55% de las espigas tuvieron una amplitud entre 5-79 pA en las CCs de WKY y SHR respectivamente. El 21% de las espigas de las CCs de WKY y 38% de las espigas de las SHR se encuentran en el rango entre 80-219 pA de amplitud; mientras que en rangos mayores a 220 pA de amplitud se encontraron 3% de las espigas de las CCs de WKY y 7% de las CCs de SHR (Fig. 16).

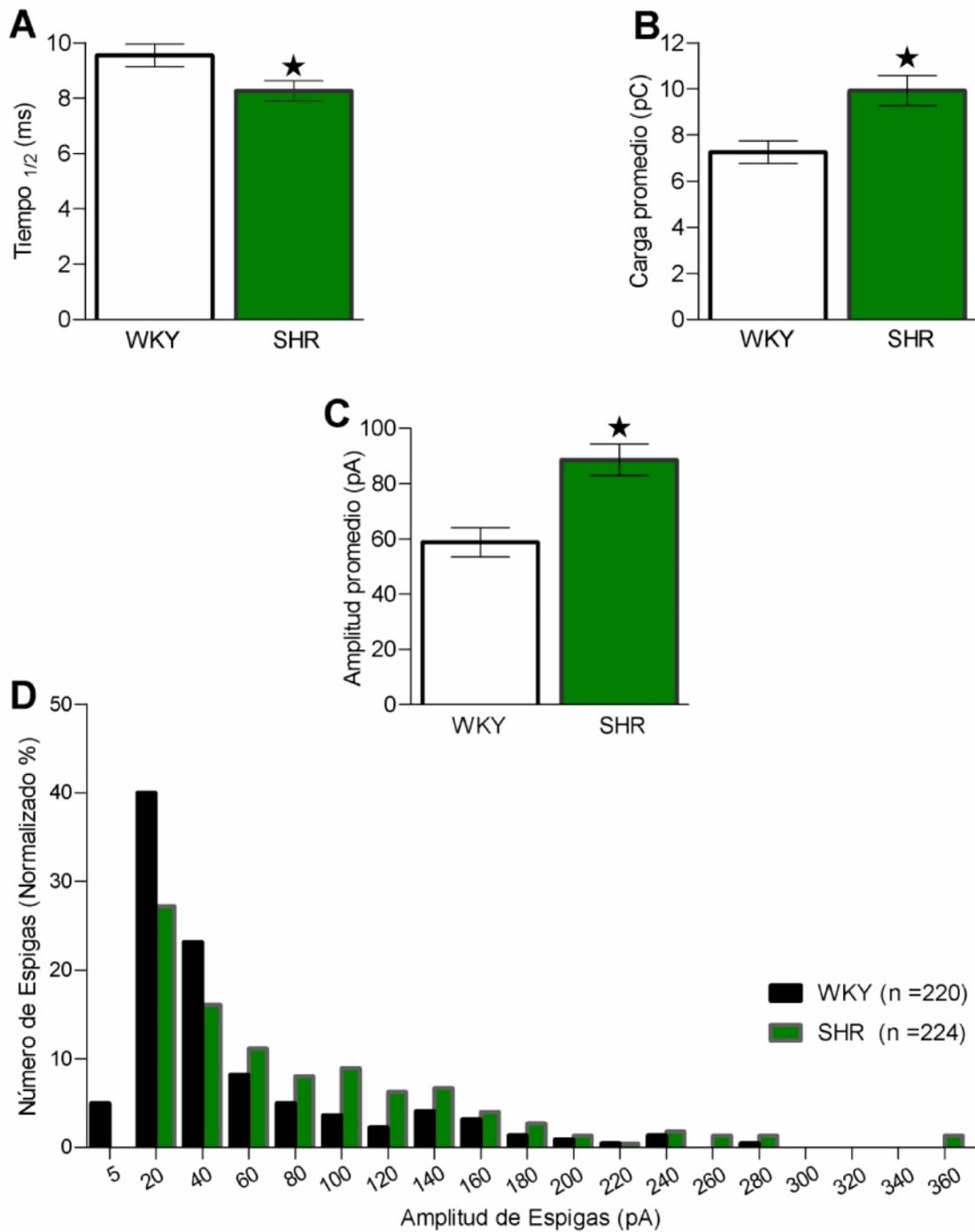


Figura 16. Comparación de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en las CCs de ratas WKY y SHR después de un pulso de cafeína. (A) Tiempo $_{1/2}$, (B) Carga promedio, (C) Amplitud promedio $I_{m\acute{a}x}$ y (D) Distribución de frecuencia de la amplitud máxima de las espigas amperométricas registradas en las CCs de ambas cepas. Cada barra representa la media \pm ESM (A, B y C), * $p < 0.001$; y el porcentaje de espigas (D), $n =$ número total de espigas.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de las espigas obtenidas tras un pulso de alto K⁺ y Cafeína de las CCs de las ratas WKY y SHR.

	K⁺ 60 mM				Cafeína 10 mM			
	t_½ (ms)	Carga Promedio (pC)	I_{max} (pA)	No. Espigas	t_½ (ms)	Carga Promedio (pC)	I_{max} (pA)	No. Espigas
WKY	10.1 ± 0.3	4.8 ± 0.2	38.9 ± 3.2	271	10.6 ± 0.5	7.2 ± 0.4	58.8 ± 5.2	220
SHR	7.8 ± 0.3*	6.8 ± 0.3*	60.9 ± 3.4*	269	8.2 ± 0.3*	9.9 ± 0.6*	88.6 ± 5.6*	224

Cada valor es la media ± ESM, ***p < 0.001**; n= 9 células para cada cepa para ambos tratamientos.

Finalmente, después de aplicación de un pulso con cafeína, las CCs de las ratas SHR mostraron un mayor porcentaje de espigas con pie (68 ± 3.1%) en comparación a las espigas de las CCs de las ratas WKY (52.1 ± 4.2%) siendo esta diferencia significativa (p<0.05).

5. LA SALIDA DEL CA²⁺ DEL RE FAVORECE LA LIBERACIÓN DE VESÍCULAS DE SECRECIÓN CON UN MAYOR CONTENIDO DE CA EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR VS WKY.

Los resultados presentados en las dos secciones anteriores demuestran que las CCs de las ratas SHR secretan una mayor cantidad de CA, tanto en respuesta a la entrada de Ca²⁺ por la apertura de los CCDV (despolarización con alto K⁺) como tras el vaciamiento del Ca²⁺ del RE (mediante cafeína). Sin embargo, cabe plantearse las siguientes preguntas:

- 1) ¿La salida del Ca²⁺ del RE promueve la exocitosis de una mayor cantidad de vesículas en comparación con la secreción que se dispara por la entrada de Ca²⁺ a través de los CCDV?
- 2) ¿Las espigas amperométricas sugieren un mayor contenido de CA por vesícula de secreción en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY?
- 3) De ser así, ¿Cuál de estos dos mecanismos (la liberación de una mayor cantidad de vesículas de secreción o mayor contenido de CA por vesícula) tendría una mayor contribución a la hipersecreción de CA observada en las CCs de las ratas SHR?

Para tratar de responder estas preguntas, se compararon los parámetros cinéticos de las espigas registradas en respuesta a cafeína con respecto a las registradas tras una despolarización por alto K⁺ en las las CCs de las ratas WKY. Como se muestra en la Tabla 3, la duración media (t_{1/2}) de las espigas obtenidas por cafeína (10.6 ± 0.5 ms) y las provocadas por alto K⁺ (10.1 ± 0.3

ms) fue similar ($p > 0.05$). En cambio, la carga promedio (Q) de las espigas producidas por cafeína (7.2 ± 0.4 pC) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que con alto K^+ (4.8 ± 0.2 pC). De la misma manera, la amplitud promedio (I_{max}) de las espigas producidas fue significativamente mayor ($p < 0.05$) después de la aplicación de cafeína (58.8 ± 5.2 pA) que por un pulso con alto K^+ (38.9 ± 3.2 pA, Fig 17).

Cuando se analizó la distribución de la amplitud máxima (I_{max}) de las espigas obtenidas en las CCs de las ratas WKY, se observó que 92% de las espigas registradas tras un pulso de alto K^+ se encuentran en el rango de 5-99 pA, seguido de 7% para el rango de 100-219 pA y un 1% para >220 pA de amplitud. Por otra parte, en la distribución de la amplitud máxima (I_{max}) de las espigas generadas tras un pulso de cafeína se observa un 81% de las espigas en el rango de 5-99 pA, seguido de 16% para el rango 100-219 pA y 3% en el rango >220 pA en las CCs de las ratas WKY (Fig.17). Estos resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV promueve la exocitosis de vesículas de secreción con un menor contenido de CA en las CCs de las ratas WKY, en tanto que la liberación de Ca^{2+} del RE parece favorecer la exocitosis de vesículas con un mayor contenido de CA (Fig.17).

Estos resultados destacan la importancia de la amplificación de la señal de Ca^{2+} por CICR en el reclutamiento y fusión de las vesículas de secreción de las CCs de las ratas WKY. Por lo tanto, sería interesante investigar qué sucedería en la secreción de CA en las CCs si se bloquea de manera específica de la salida del Ca^{2+} del RE a través de los receptores de Rianodina (RyR). La aproximación experimental para resolver esta pregunta se aborda más adelante en la Sección 6.

Por otro lado, también se compararon los parámetros cinéticos y la distribución de amplitud máxima (I_{max}) de las espigas amperométricas producidas por la aplicación de cafeína y tras un pulso de alto K^+ en las CCs de las ratas SHR. La duración media ($t_{1/2}$) fue similar ($p > 0.05$) en las espigas generadas mediante la aplicación de cafeína (8.2 ± 0.3 ms) y las generadas tras un pulso con alto K^+ (7.8 ± 0.3 ms). En cambio, la carga promedio (Q) de las espigas generadas por cafeína (9.9 ± 0.6 pC) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que las obtenidas mediante un pulso con alto K^+ (6.8 ± 0.3 pC). Asimismo, la amplitud promedio (I_{max}) por espiga fue significativamente mayor ($p < 0.05$) después de la aplicación de cafeína (88.6 ± 5.6 pA) que después de un pulso con alto K^+ (60.9 ± 3.4 pA, Fig. 17 y Tabla 3).

Al comparar la distribución de la amplitud máxima (I_{max}) de las espigas amperométricas de las CCs de las ratas SHR tras un pulso con alto K^+ se observó que un 82% de las espigas tras un pulso de alto K^+ se encuentran en el rango de 5-99 pA, seguido de 14% para el rango de 100-219 pA y un 4% para el rango >220 pA. Después de la aplicación de cafeína la distribución fue de 63%

de las espigas en el rango de 5-99 pA de amplitud, seguido de 30% para el rango 100-219 pA y un 7% en el rango >220 pA de amplitud (Fig.17).

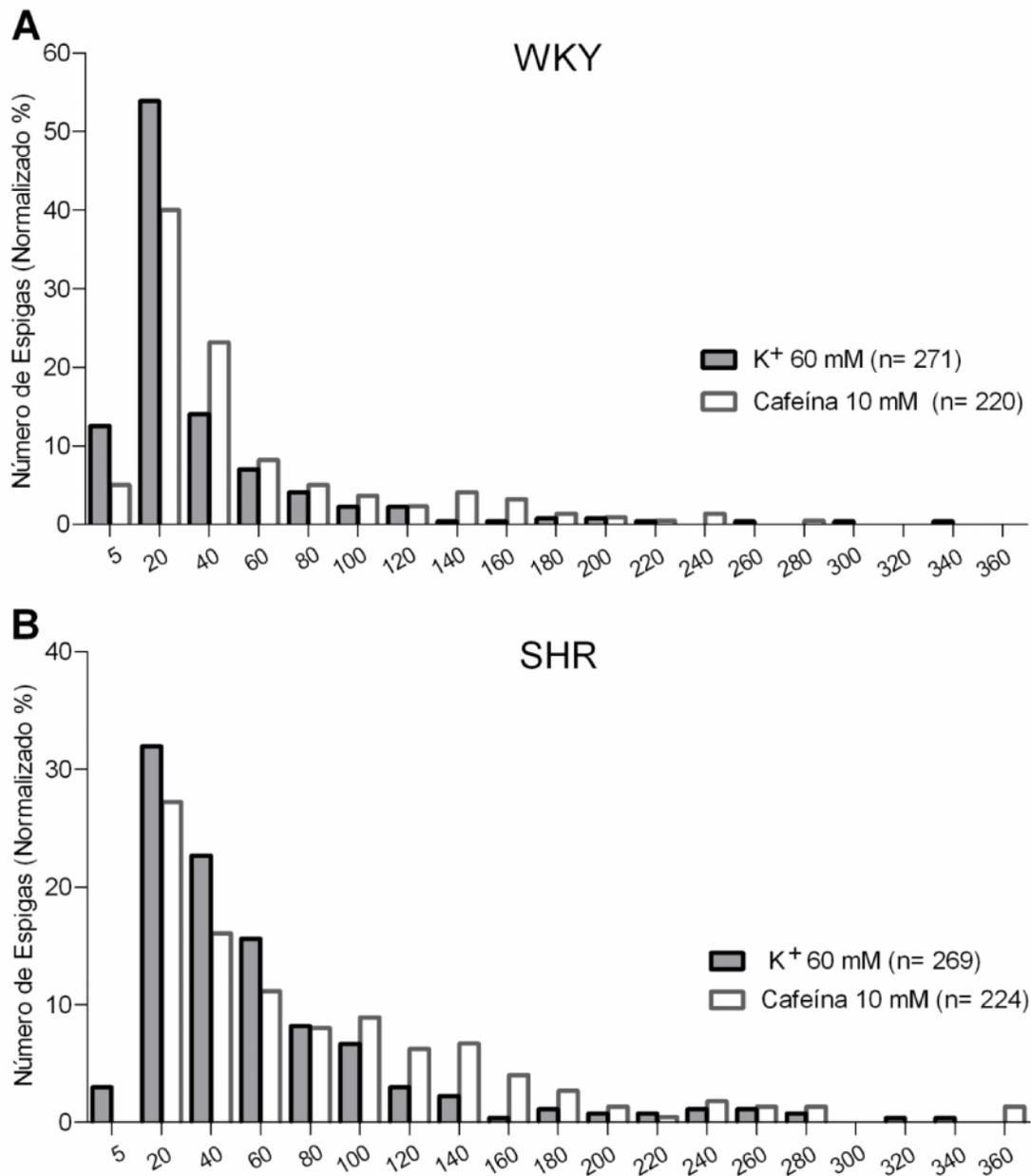


Figura 17. Comparación de la distribución de la amplitud máxima de las espigas amperométricas después de la aplicación de un pulso de alto K⁺ o un pulso de cafeína. A) CCs de las ratas WKY y B) CCs de las ratas SHR. Cada barra representa el porcentaje del número de espigas con respecto al número total obtenido para cada tratamiento. n= número total de espigas.

Los resultados presentados hasta ahora señalan varios aspectos importantes. En primera instancia, la liberación de Ca^{2+} del RE (mediante la aplicación de cafeína) favorece la movilización y exocitosis de vesículas de secreción con mayor cantidad de CA en comparación con la contribución de la entrada de Ca^{2+} por los CCDV (despolarización con alto K^+). Este resultado fue observado tanto en las CCs de las ratas WKY como en las ratas SHR. En cambio, la entrada de Ca^{2+} por los CCDV parece favorecer la fusión de vesículas de CA con menor contenido de CA. Esto sugiere que el tipo de gránulo a fusionarse y la exocitosis de CA está determinado los distintos mecanismos que desencadenan el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por otro lado, en las CCs de las ratas hipertensas predomina la fusión de gránulos de secreción con mayor contenido de CA en comparación a lo observado para las CCs de la cepa WKY ya sea tras un pulso de K^+ o cafeína.

6. EFECTO DEL BLOQUEO ESPECÍFICO DE LA SALIDA DE Ca^{2+} DEL RE A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES DE RIANODINA SOBRE LA LIBERACIÓN DE CA EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR Y WKY.

Con el fin estudiar si el bloqueo específico de la salida de Ca^{2+} del RE afecta la liberación de CA en las CCs de las ratas WKY y SHR se utilizó 10 μM de Rianodina (Ry), concentración a la cual actúa como antagonista de los receptores RyR en el RE.

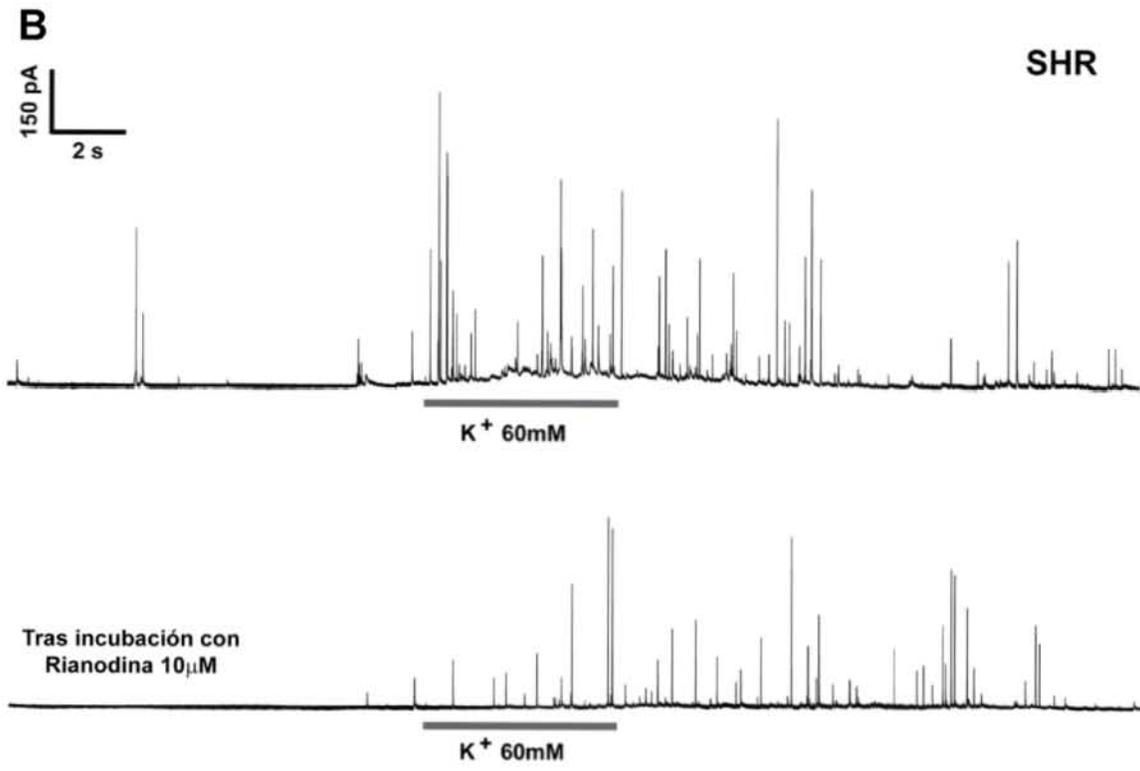
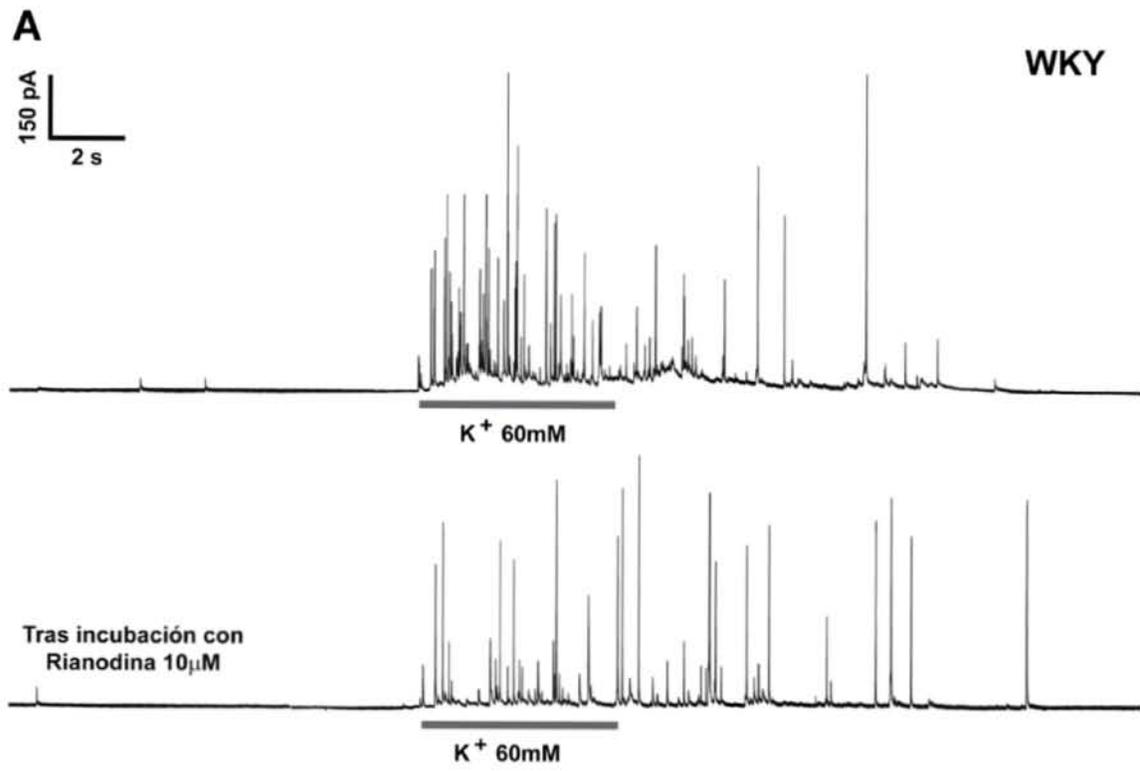
Para ello, al terminar el periodo de registro basal (120 s) se aplicó un pulso de K^+ 60 mM durante 5 s y se registró la respuesta obtenida durante los siguientes 120 s. Posteriormente, la célula cromafin evaluada se incubó durante 10 min en presencia de Ry 10 μM con la finalidad de bloquear la salida de Ca^{2+} del RE a través de los receptores RyR. Al término de los 10 min de la incubación con Ry, y aún en presencia de ésta se aplicó otro pulso idéntico con alto K^+ 60 mM durante 5 s y se registró la respuesta durante 120 s más.

Al término de estos dos registros se corroboró la viabilidad de las CCs mediante la aplicación adicional de un pulso con K^+ 60 mM. Con esto se constató que la célula seguía liberando CA. Es importante mencionar que se realizaron experimentos piloto (no mostrados) para asegurarnos que al aplicar dos pulsos de alto K^+ separados por un intervalo de 2 min. la liberación de CA de las CCs fuese similar. Esto fue cierto para ambas cepas de ratas. Estos experimentos piloto nos dieron la seguridad de que los resultados obtenidos fueron por el efecto de la incubación con Ry y no debido a una fatiga de la maquinaria de exocitosis, del agotamiento de los reservorios de Ca^{2+} o de la poza de gránulos de secreción.

La comparación de la liberación de CA producida tras la aplicación de un pulso de alto K^+ antes y después de 10 min de incubación con Ry 10 μ M se ilustra en la Fig. 18. El panel A de la Fig. 18 se muestra un registro representativo de la secreción de CA luego de un pulso con alto K^+ (5 s) en una célula cromafin de rata WKY en condiciones control (trazo superior). Puede observarse que la liberación de CA ocurre de forma inmediata (similar a lo descrito en la Sección 3). Después de la incubación con Ry (10 min) la secreción de CA en la misma célula disminuyó (trazo inferior) aunque las espigas registradas se asemejaron bastante a las registradas antes de la incubación con Ry.

En el panel B de la Fig. 18 se muestra un registro representativo de la liberación de CA inducida por un pulso con alto K^+ en una célula cromafin de una rata SHR en condición control (trazo superior). El trazo inferior es el registro de la misma célula después de la incubación con Ry (10 μ M). Nótese que la aplicación después de un segundo pulso de alto K^+ provocó una disminución considerable en la liberación de CA en la célula cromafin SHR. Esta disminución posterior a la incubación con Ry fue más acentuada en las CCs de las ratas SHR que en las ratas WKY.

En la Fig.19 (A y B) se muestra la gráfica de carga acumulada de las espigas amperométricas en función del tiempo tras la aplicación de un pulso de alto K^+ antes y después de la incubación con Ry 10 μ M para ambas cepas. En las CCs de ratas WKY, la carga acumulada no se modificó ($p > 0.05$) después de la incubación con Ry. Los valores máximos de carga acumulada alcanzados fueron 422.1 ± 118.7 pC (control) y 339.2 ± 119.7 pC (Ry). En contraste, la carga acumulada luego de un pulso de alto K^+ disminuyó (~4 veces) después de la incubación con Ry en las CCs de las ratas SHR. Los valores máximos de carga acumulada alcanzados fueron de 842.1 ± 182 pC (control) y 183.2 ± 87.4 pC (Ry) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). En los incisos C y D de la Fig. 19, muestran la comparación de la frecuencia acumulada de las espigas amperométricas en función del tiempo siguiendo misma la estrategia experimental para los incisos A y B. En las CCs de ratas WKY, la frecuencia acumulada máxima a los 30 s antes de la incubación con Ry no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$) después de la incubación con Ry. Los valores máximos de frecuencia acumulada fueron 33 ± 3.4 espigas (control) y 25 ± 3 espigas (Ry). Por el contrario, en las CCs de las ratas SHR, los valores de frecuencia acumulada fueron de 45.4 ± 6 espigas (control) y 15.4 ± 2 espigas (Ry) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Estos datos sugieren que la liberación de Ca^{2+} del RE y el mecanismo de CICR tienen una mayor contribución a la liberación de CA en las CCs de las ratas SHR que en las CCs de las ratas WKY.



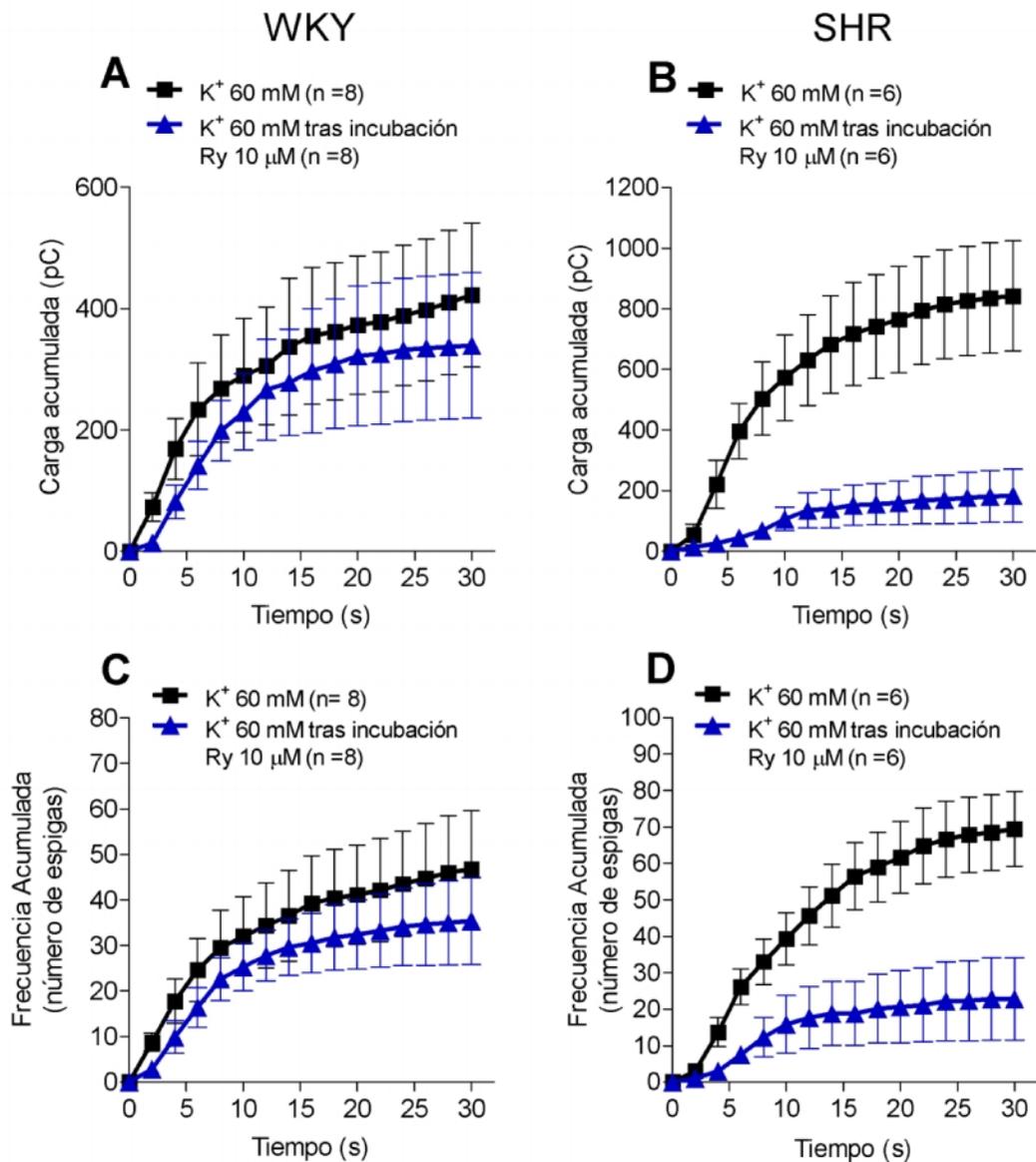


Figura 19. Comparación de la carga acumulada y frecuencia acumulada en función del tiempo de las espigas amperométricas después de un pulso de alto K⁺ (60 mM) antes y después de la incubación con 10 μM Rianodina (Ry, 10 min). Datos de CCs de ratas WKY (A) y SHR (B). Cada punto es la media ± ESM; n= número de células. Tiempo 0= inicio del pulso de alto K⁺.

En las Fig. 20 y 21 se compararon los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas obtenidas tras la aplicación de un pulso de alto K⁺ antes y después de la incubación con Ry 10 μM para las CCs de las ratas WKY y SHR.

En las CCs de las ratas WKY, las espigas registradas tuvieron una duración media ($t_{1/2}$) significativamente menor ($p < 0.05$) después de la incubación con Ry (7.4 ± 0.2 ms) en comparación con la duración media ($t_{1/2}$) control (9.5 ± 0.1 ms, Fig.20A). Los valores de carga promedio (Q) antes (9.7 ± 0.3 pA) y después (9.1 ± 0.6 pA) de la incubación con Ry en las CCs de las ratas WKY fueron similares ($p > 0.05$, Fig 20B). La amplitud promedio (I_{max}) de las espigas generadas tras un pulso de alto K^+ (82.9 ± 3.1 pA) fue significativamente mayor ($p > 0.05$) después de la incubación con Ry (102.3 ± 5.9 pA). El número de espigas obtenidas tras un pulso de alto K^+ después de la incubación con Ry disminuyó (749 espigas vs 317 espigas) en las CCs de las ratas WKY (Fig.21A).

En las CCs de las ratas SHR, después de un pulso de alto K^+ , se observó que la duración media ($t_{1/2}$) fue similar antes y después de la incubación con Ry (control: 7.4 ± 0.2 ms vs Ry: 7.3 ± 0.3 ms; respectivamente, Fig.20A). Los valores de carga promedio (Q) fueron significativamente menores ($p < 0.05$) después de la incubación con Ry (control: 11.9 ± 0.5 ; Ry: 7.8 ± 0.5 pC, Fig 20B). La amplitud promedio (I_{max}) de las espigas disminuyó significativamente ($p < 0.05$) después de la incubación con Ry (control: 114 ± 5.3 pA vs Ry: 79.6 ± 5.6 pA) en las CCs de las ratas SHR. El número de espigas también disminuyó considerablemente después de la incubación con Ry (448 vs 152 espigas; Fig. 21A).

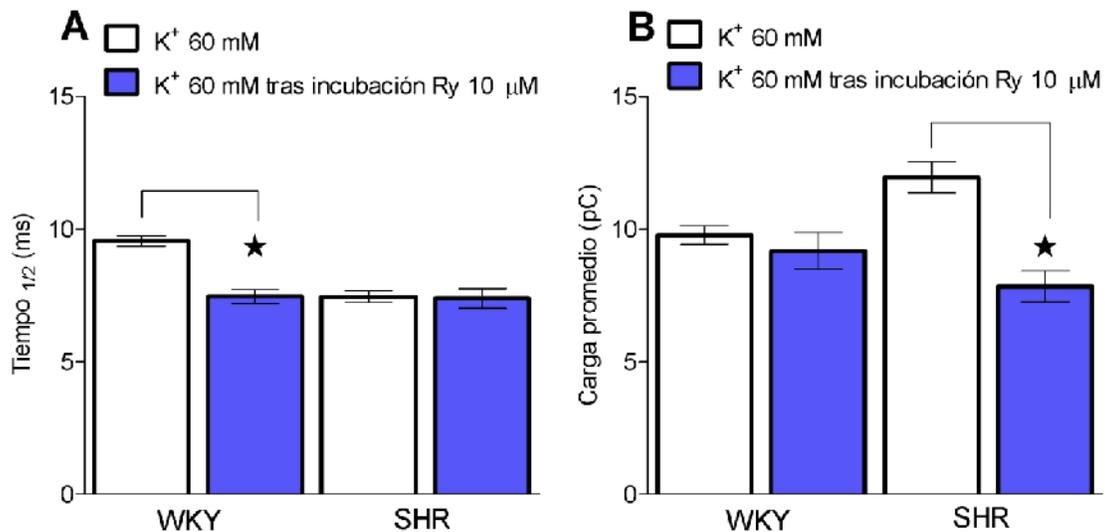
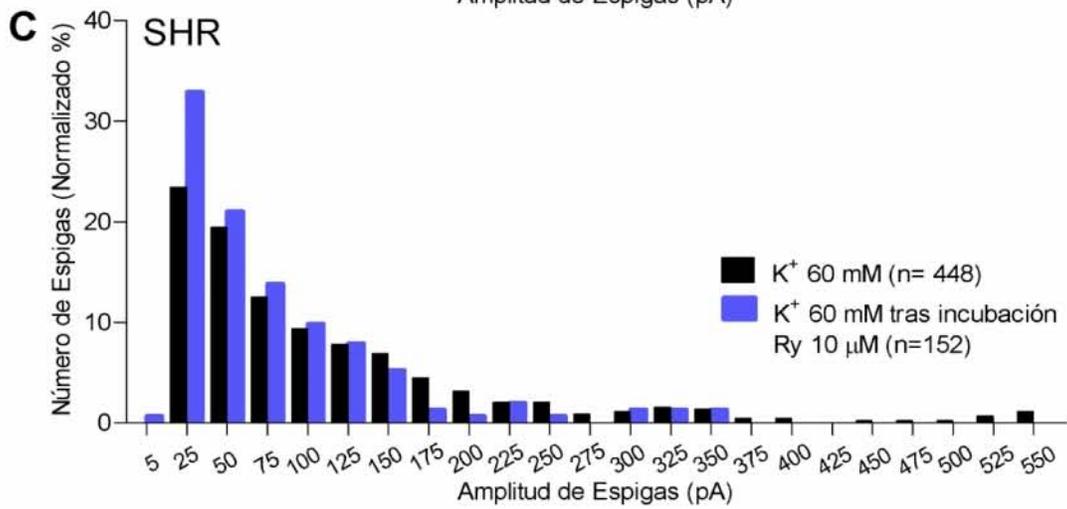
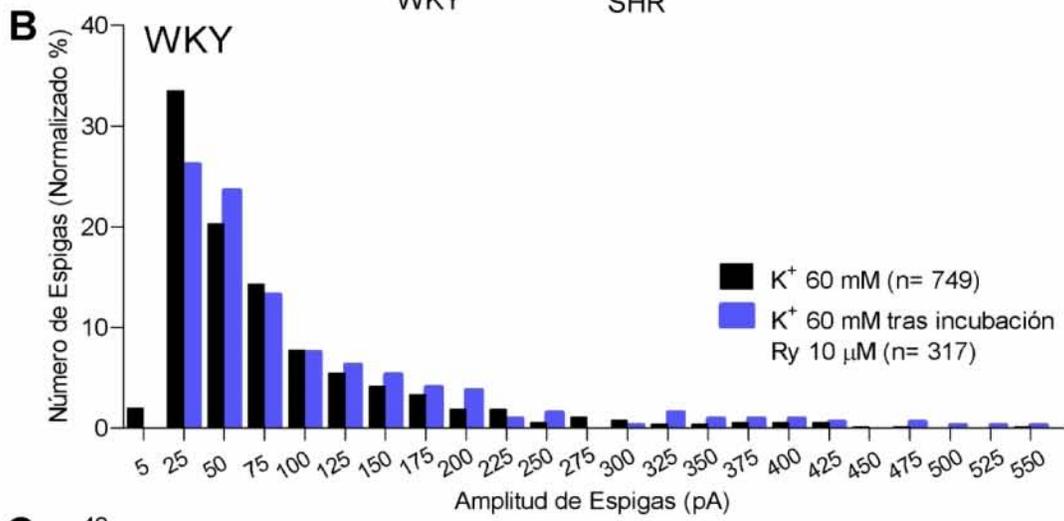
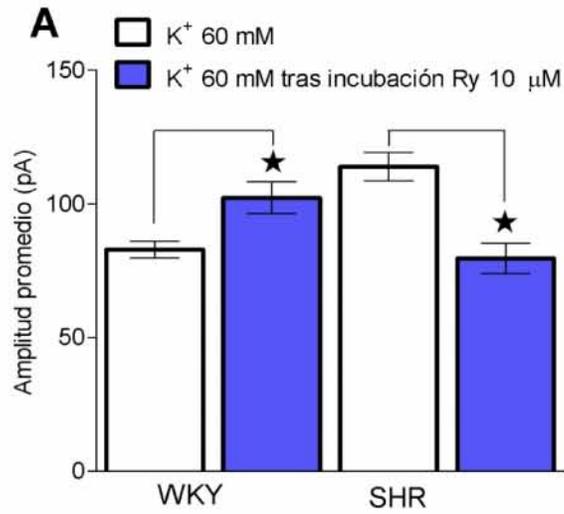


Figura 20. Comparación de la duración media ($t_{1/2}$) y carga promedio (Q) de las espigas amperométricas de las CCs de las ratas WKY y SHR tras una despolarización con alto K^+ antes y después de la incubación con 10 μ M de Ry. (A) Tiempo medio ($t_{1/2}$) y (B) carga promedio de las espigas amperométricas registradas de las CCs de las ratas WKY y SHR. Cada barra representa la media \pm ESM, * $p < 0.05$.



En la Fig. 21B, en las CCs de las ratas WK, la distribución de la amplitud máxima de las espigas tras de un pulso de alto K⁺ (control) fue de 78% de las espigas en el rango de 5-124 pA, seguido de 15% en el rango de 125-224 pA y un 7% en el rango >225 pA. Después de la incubación con Ry, se distribuyeron en 71% en el rango de 5-124 pA de amplitud, seguido de 20% para el rango 125-224 pA y un 9% en el rango >225 pA de amplitud. La distribución de la amplitud máxima de las espigas generadas por un pulso con alto K⁺ fue bastante homogénea antes y después de la incubación con Ry en las CCs de las ratas WKY.

En la figura 21C, en las CCs de las ratas SHR, la distribución de amplitudes de las espigas amperométricas tras de un pulso con alto K⁺ fue de un 65% de las espigas en el rango de 5-124 pA, seguido de 23% en el rango de 125-224 pA y un 12% para el rango >225 pA. Después de la incubación con Ry, se distribuyeron en un 78% en el rango de 5-124 pA de amplitud, seguido 15% en el rango 125-224 pA y un 7% en el rango >225 pA de amplitud. La distribución de la amplitud máxima de las espigas generadas tras un pulso con alto K⁺ después de la incubación con Ry predominó en rangos menores a 150 pA en comparación con las obtenidas antes de la incubación con Ry en las CCs de las ratas SHR.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de las espigas obtenidas en las CCs de las ratas WKY y SHR. tras la aplicación de un pulso con alto K⁺ antes y después de la incubación con 10 μM de Ry durante 10 min.

	WKY				SHR			
	t 1/2 (ms)	Carga Promedio (pC)	I _{max} (pA)	No. espigas	t 1/2 (ms)	Carga Promedio (pC)	I _{max} (pA)	No. espigas
A	9.5 ± 0.1	9.7 ± 0.3	82.9 ± 3.1	749	7.4 ± 0.2	11.9 ± 0.5	114 ± 5.3	448
B	7.4 ± 0.2*	9.1 ± 0.6	102.3 ± 5.9*	317	7.3 ± 0.3	7.8 ± 0.5*	79.6 ± 5.6*	152

A: Pulso control K⁺ 60 mM.

B: Pulso de K⁺ 60 mM después de la incubación durante 10 min de 10 μM de Rianodina.

Cada valor es la media ± ESM, *p<0.05. n= 8 células para cepa WKY y 6 células para cepa SHR.

Finalmente, en las CCs de las ratas WKY y SHR no se encontraron diferencias significativas (p>0.05) en cuanto a la presencia de pie de las espigas tras un pulso con alto K⁺ ni antes (WKY: 66.7 ± 6.2% y SHR: 65.6 ± 8.1%) ni después de la incubación con Ry (WKY: 67.5 ± 2% y SHR 60.1 ± 7.3%) para ambas cepas.

VIII. DISCUSIÓN

1. LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR PRESENTAN UNA MAYOR ACTIVIDAD DE LIBERACIÓN ESPONTÁNEA DE CA EN COMPARACIÓN CON LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS WKY

Nuestros resultados muestran que 94% de las CCs en las ratas SHR presentaron liberación espontánea de CA, mientras que las CCs de las ratas WKY fue un porcentaje ligeramente menor (77%, Fig11). Esto no se había sido reportado anteriormente lo cual aporta nueva información. En el estudio realizado por Miranda-Ferreira *et al.* 2008, mencionan que las CCs de ratas SHR y normotensas Sprague Dawley de 16 semanas de edad no mostraron una liberación espontánea de CA. Las pocas CCs que presentaron liberación espontánea de CA fueron descartadas de su análisis. Nuestro trabajo muestra por primera vez utilizando la técnica de amperometría que las CCs de las ratas WKY y SHR en etapas iniciales de la hipertensión arterial esencial liberan CA de forma espontánea.

Es posible que esta discrepancia entre nuestro estudio y lo reportado por Miranda-Ferreira *et al.* 2008 se atribuya a diferencias metodológicas (*i.e.* condiciones menos agresivas para la digestión enzimática para la obtención de cultivos celulares, Domínguez *et al.*, 2012) y/o al uso de ratas de diferente edad (7-12 semanas de edad en nuestro estudio vs 16 semanas, Miranda-Ferreira *et al.* 2008). Además, una diferencia crucial entre nuestro estudio y lo reportado por este grupo de investigación es la comparación de los resultados obtenidos en las ratas SHR con el control adecuado, las ratas WKY, no siendo así para el estudio de Miranda-Ferreira *et al.* 2008 (control normotenso, ratas Sprague Dawley).

Con el fin de comparar la cantidad de CA liberadas a lo largo del tiempo se obtuvo la carga acumulada y la frecuencia acumulada de las espigas amperométricas de las CCs para ambas cepas (Fig 11). No se encontraron diferencias importantes en la carga acumulada ni en la frecuencia acumulada de las espigas registradas entre las CCs de las ratas SHR vs WKY. Estos resultado coinciden con lo reportado por Lim *et al.* 2002 quienes no observaron diferencias en la liberación basal de CA por perfusión colectada en glándulas adrenales aisladas de ratas SHR y WKY cuantificadas por fluorometría (21 ± 3 ng de CA en 2 min para ambas cepas). Cabe mencionar que la técnica utilizada por Lim *et al.* 2002 solamente cuantificó de manera global de las CA de manera indirecta (por fluorescencia) por perfusión de la glándula adrenal aislada. La técnica de amperometría, en cambio, permitió medir las CA liberadas al nivel de gránulos secretores individuales con mayor resolución espacio-temporal. Aunque la cantidad de CA liberadas a lo largo del tiempo fue similar para ambas cepas, nuestros resultados mostraron que las CCs de las ratas

SHR liberan una mayor cantidad de CA por vesícula de secreción (espigas con mayor carga y amplitud promedio) y en menor tiempo ($t_{1/2}$) en comparación con las CCs de las ratas WKY (Fig. 12).

¿Cuáles podrían ser los posibles mecanismos implicados en la liberación espontánea de CA en las CCs de las ratas WKY y SHR? Hasta el día de hoy no se conocen del todo los mecanismos que regulan la secreción constitutiva. Los estudios existentes señalan que al generarse un potencial de acción en las CCs se desencadena el transporte, fusión de las vesículas y la liberación de CA en CCs de la rata (Kidokoro & Ritchie, 1980; Zhou & Mislér, 1995). Las CCs de los roedores disparan potenciales de acción de forma continua y arrítmica (Brandt *et al.*, 1976). En parte, esta secreción basal de CA puede deberse a la actividad eléctrica espontánea (García *et al.*, 2006; de Diego *et al.*, 2008). Además, se ha observado que las fluctuaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ también influyen en la liberación de CA en las CCs (D'Andrea & Thorn, 1996), donde la salida del Ca^{2+} de las pozas intracelulares promueven la movilización, fusión de las vesículas de secreción y subsecuente liberación de CA al medio extracelular (Malgaroli *et al.*, 1990). Se ha propuesto que la secreción constitutiva es activa a bajos niveles de Ca^{2+} en el citosol en las CCs en reposo (Artalejo, 1995, Lukyanetz, 2001).

Resultados preliminares de nuestro laboratorio (Jiménez *et al.*, 2013) indican que las CCs provenientes de las ratas SHR (60.7% del total de las CCs analizadas) presentan fluctuaciones espontáneas de Ca^{2+} citosólico en condiciones de reposo de mayor amplitud y frecuencia, en comparación de las CCs de las ratas WKY (43.5% del total de las CCs analizadas). De ser así, una mayor señal de Ca^{2+} intracelular en reposo podría reflejarse en un mayor reclutamiento de vesículas con mayor contenido de CA para su exocitosis en las CCs en las ratas SHR.

Desconocemos la razón por la cual la liberación de las CA de las vesículas de secreción ocurre más rápidamente en las CCs de las ratas SHR en comparación con las WKY. Sin embargo, se sabe que diversos componentes de la matriz intravesicular juegan un papel importante en la regulación final y en la cinética de la exocitosis de CA. Los gránulos cromafines almacenan además de CA, cromograninas, ATP, ascorbato, péptidos y grandes concentraciones de Ca^{2+} (Sección 4.3, Machado *et al.*, 2009, Alvarez, 2012). La matriz intravesicular no limita su papel a la asociación pasiva de sus componentes solubles. En recientes fechas, se ha señalado que el Ca^{2+} al interior de la vesícula puede participar en la propia exocitosis al servir como fuente puntual de Ca^{2+} justo en el sitio de exocitosis (Mitchell *et al.*, 2001, Alvarez, 2012). En base a nuestros resultados, no podemos saber cuales de todos estos componentes que conforman la matriz intravesicular podrían estar modificando la cinética de la liberación de CA de los gránulos de secreción, sin embargo, es posible que en las CCs de las ratas SHR existan factores que faciliten la liberación de las CA de las vesículas cromafines y por lo tanto, ocurra más rápidamente.

2. LA LIBERACIÓN DE CA INDUCIDA POR UNA DESPolarIZACIÓN CON ALTO K⁺ ES MAYOR EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR

Después de una despolarización de la célula tras un pulso de alto K (permitiendo la entrada de Ca²⁺ por la activación de los CCDV) se dispara de manera inmediata la liberación de CA en las CCs de ambas cepas; siendo la carga acumulada máxima de las espigas ~2 veces mayor, además, un incremento significativo en la frecuencia acumulada en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY (Fig. 13).

Los resultados de este estudio apoyan las evidencias señaladas por Lim *et al.*, 2002 quienes al perfundir las glándulas adrenales aislada de la ratas SHR y WKY con una solución de alto K⁺, observaron una mayor secreción de CA en las ratas SHR (278 ± 22 ng) en comparación con las ratas WKY (198 ± 16 ng) en 4 min de perfusión. Nuestros resultados señalan que las CCs de las ratas SHR liberan una mayor cantidad de CA tras un pulso con alto K⁺ por gránulo de secreción (espigas con mayor carga y amplitud promedio) y en menor tiempo (t_{1/2}) en comparación con las CCs de las ratas WKY (Fig. 14). Estos datos coinciden con lo reportado por Miranda-Ferreira *et al.*, 2008, quienes demostraron que después de un pulso de alto K⁺, las CCs de ratas SHR de 16 semanas de edad muestran una hipersecreción de CA y un aumento en la frecuencia de las espigas obtenidas con respecto a las ratas normotensas Sprawley Dawley. Las espigas obtenidas en las CCs de las ratas SHR por este grupo también fueron de mayor carga y amplitud promedio; y menor duración en comparación con el control normotenso.

La distribución de la amplitud máxima de las espigas de las CCs en las ratas SHR y WKY (Fig. 14) sugiere que dentro de la población total de gránulos de secreción en las CCs de las ratas SHR existe una subpoblación de gránulos que liberan un mayor contenido de CA, la cual no parece estar presente en las CCs de las ratas WKY. Hasta el momento no se ha realizado ningún estudio comparativo con el fin de elucidar si las CCs de las ratas SHR poseen vesículas de secreción con mayor tamaño y/o mayor cantidad de CA en comparación con las CCs WKY. Es necesario realizar en el futuro próximo un estudio morfológico (mediante microscopía electrónica) y comparar las CCs de ambas cepas para poder responder esta pregunta. Los reportes disponibles indican que la glándula adrenal de las ratas SHR de 4 semanas de edad contiene una mayor cantidad de adrenalina que en las ratas WKY cuantificada por HPLC con detección electroquímica (Maemura *et al.*, 1982). Además, Schober *et al.*, 1989 utilizando la misma técnica reportaron que en la glándula adrenal de las ratas SPSHR (*Stroke-prone spontaneously hypertensive rats*, una cepa derivada de la ratas SHR) de 4 y 8 semanas de edad contiene una mayor cantidad de CA en comparación con las ratas WKY.

Aunque en las CCs de la cepa SHR pareciera existir una subpoblación de gránulos de secreción con una mayor cantidad de CA, este no sería el único mecanismo que pudiera contribuir a la hipersecreción de CA. Datos de nuestro laboratorio (Jiménez *et al.*, 2013) señalan que los transitorios de Ca^{2+} generados por una despolarización con alto K^+ son de mayor amplitud y decaen más lentamente en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY. Resultados similares de Li *et al.*, 2012 muestran que en neuronas en cultivo del ganglio simpático cervical superior de ratas SHR pre-hipertensas (4 semanas de edad) se producen transitorios de Ca^{2+} de mayor amplitud tras una despolarización con alto K^+ . Por lo tanto, alteraciones en la homeostasis y dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ podrían influir en una mayor liberación de CA en las CCs de las ratas SHR.

3. LA LIBERACIÓN DE Ca^{2+} DEL RE POR CAFEÍNA GENERA UNA MAYOR SECRECIÓN DE CA EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR

Después de la aplicación de un pulso de cafeína se produce una elevación del Ca^{2+} intracelular por el vaciamiento del Ca^{2+} almacenado en el RE a través de los receptores de Rianodina, lo cual produjo la liberación de CA en las CCs de ambas cepas con un retraso de 2-3 s; siendo la carga acumulada máxima de las espigas ~2 veces mayor en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY, además, con un incremento significativo en la frecuencia acumulada en las CCs de las ratas SHR en comparación con las CCs de las ratas WKY (Fig. 15). Además, las CCs de las ratas SHR liberaron una mayor cantidad de CA tras un pulso con cafeína por vesícula de secreción (espigas con mayor carga y amplitud promedio) y en menor tiempo ($t_{1/2}$) en comparación con las CCs de las ratas WKY (Fig. 16).

Nuestros resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por Miranda-Ferreira *et al.*, 2009, quienes evaluaron la liberación de CA en las CCs de ratas SHR y Sprague Dawley tras una aplicación aguda de una mezcla de cafeína (20 mM), rianodina (10 μM , antagonista de los RyR) y tapsigargina (1 μM , antagonista de la ATPasa de Ca^{2+} del RE) para evaluar el aporte del Ca^{2+} del RE en ratas de 16 semanas de edad. En este trabajo, la liberación de CA presentó un retraso de 2 s tras la aplicación de la mezcla CRT (cafeína, rianodina, tapsigargina) en ambas cepas (similar a lo observado en nuestros trazos). Las espigas amperométricas obtenidas fueron de mayor amplitud y carga promedio, y $t_{1/2}$ menor en las CCs de las ratas SHR con respecto a las ratas Sprague Dawley. Sin embargo, la respuesta secretora producida por la mezcla CRT fue de mayor duración en las CCs de las ratas Sprague Dawley (7 s) y en las CCs de las ratas SHR (30 s) en comparación con nuestros resultados (5-6 s de duración para ambas cepas). Esta diferencia podría deberse a la estrategia farmacológica utilizada por Miranda-Ferreira *et al.*, 2009, la cual no fue

selectiva ni permitió distinguir si la salida y/o la recaptura del Ca^{2+} por el RE influye en la exocitosis de las CA en las CCs. Sumado a esto, Miranda-Ferreira *et al.*, 2009 no observaron diferencias al comparar los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas obtenidas tras una despolarización con K^+ y tras la aplicación de la mezcla CRT en las CCs para ambas cepas, lo que los llevó a concluir y descartar la participación del Ca^{2+} del RE en la hipersecreción de CA en las CCs de las ratas SHR en la etapa de la hipertensión avanzada.

Nuestros resultados sugieren que el papel del Ca^{2+} proveniente del RE parece ser muy importante en la hipersecreción de CA en las CCs de las ratas SHR. Además, coinciden con Lim *et al.*, 2002, quienes demostraron que la liberación de CA tras aplicar Bay-K-8644 (un agonista de los CCDV tipo L) y ácido ciclopiazónico (inhibidor selectivo de la ATPasa de Ca^{2+} del RE) fue mayor en las glándulas adrenales de las ratas SHR en comparación a la de las ratas WKY.

Estudios en otros tipos celulares han reportado alteraciones en la concentración $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que involucran la participación del RE y coinciden con nuestros resultados. Nomura & Asano, 2002 reportaron el RE tiene una mayor capacidad de almacenaje y amortiguamiento de Ca^{2+} en las arterias mesentéricas provenientes de las ratas SHR vs WKY adultas (13 semanas de edad). Además, Sugiyama *et al.*, 1990 observaron un incremento significativo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ después de la aplicación con cafeína en el músculo liso vascular en las ratas SHR vs WKY pre-hipertensas (4 semanas de edad). Li *et al.*, 2012 reportaron una mayor capacidad almacenado de Ca^{2+} en el RE y un incremento significativamente mayor en la amplitud de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la aplicación de cafeína en las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior en las ratas SHR vs WKY prehipertensas.

Nuestros datos también coinciden con los resultados preliminares de nuestro laboratorio (Jiménez-Pérez *et al.*, 2013) donde la amplitud de los transitorios de Ca^{2+} citosólico son mayores y decaen más lentamente tras la aplicación con cafeína en las CCs de las ratas SHR vs WKY en etapas iniciales de la hipertensión arterial esencial. Todas estas evidencias apoyan la hipótesis que una mayor liberación de Ca^{2+} del RE vía CICR influye en la hipersecreción de CA en las CCs adrenales de las ratas SHR.

Postnov *et al.*, 2007 reportaron que existen alteraciones generalizadas en el manejo del Ca^{2+} intracelular y una mayor capacidad de almacenaje de Ca^{2+} en las pozas intracelulares en las ratas SHR en diversos tejidos como el hígado, cerebro, músculo liso vascular, etc. en comparación con las ratas WKY. Es posible que en las ratas SHR exista un desbalance en la dinámica del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en diversos tejidos pudiendo ser un fenómeno generalizado (fenotipo) y con un origen común, inclusive presente desde etapas pre-hipertensas.

4. LA SALIDA DE Ca^{2+} DEL RE PROMUEVE DE MANERA MÁS EFICAZ EL RECLUTAMIENTO DE VESÍCULAS CON MAYOR CONTENIDO DE CA EN COMPARACIÓN CON UNA DESPOLARIZACIÓN CON ALTO K^+

Al comparar los parámetros cinéticos y la distribución de la amplitud máxima de las espigas amperométricas obtenidas en las CCs de las ratas SHR y WKY después de la aplicación de cafeína o tras alto K^+ , se observó que la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV promueve el reclutamiento de vesículas de secreción con contenido de CA con una tendencia más homogénea tanto en las CCs de las ratas WKY y SHR. El vaciamiento de Ca^{2+} del RE parece favorecer el reclutamiento de vesículas con contenido de CA más heterogéneo, y predominó la fusión de vesículas cromafines con un mayor contenido de CA en ambas cepas (Fig.17 y Tabla 3).

Estos hallazgos apoyan la hipótesis que el Ca^{2+} proveniente de los reservorios intracelulares podría ser más “eficaz” en promover la secreción de CA por parte de las CCs de las ratas WKY y SHR. La entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV por una despolarización con alto K^+ sería menos eficaz. Lara *et al.*, 1997 reportaron utilizando CCs bovinas que la cantidad de CA liberadas tras una despolarización con K^+ es menor en comparación con la cantidad de CA liberadas tras la aplicación con cafeína monitorizadas por un detector electroquímico *on-line*.

De acuerdo con esta idea, la señal de Ca^{2+} del RE se amplifica vía CICR produciéndose un incremento mayor de $[Ca^{2+}]_i$ la cual estimula de forma más efectiva el transporte y fusión de las vesículas de secreción y la liberación de CA en las CCs de ambas cepas. La liberación de Ca^{2+} del RE hace posible que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ genere un aumento súbito en los gradientes subcelulares de Ca^{2+} de la membrana plasmática de la célula cromafin favoreciendo el aumento casi al doble de la $[Ca^{2+}]$ citosólico (Cuchillo-Ibáñez *et al.*, 2002) y por lo tanto, la exocitosis de las CA de las CCs.

5. EL BLOQUEO ESPECÍFICO DE LA SALIDA DE Ca^{2+} DEL RE A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES DE RY DISMINUYE LA LIBERACIÓN DE CA EN LAS CCs ADRENALES DE LAS RATAS SHR

Al comparar si el bloqueo específico de la salida de Ca^{2+} del RE (mediante 10 μM de Ry) afecta la liberación de CA en las CCs de las ratas WKY y SHR, se observó que en las CCs de las ratas WKY, la carga acumulada y la frecuencia acumulada máxima alcanzada tras un pulso con alto K^+ fueron similares antes y después de la incubación con Ry (Figura 18 y 19). No se observaron modificaciones respecto a los valores de carga promedio después de la incubación con

Ry, sin embargo, la liberación de CA de las vesículas de secreción ocurrió más rápidamente (menor $t_{1/2}$) e incrementó la amplitud promedio en las CCs de las ratas WKY.

Desconocemos la razón por la cual ocurren modificaciones en la duración media y la amplitud promedio después la incubación con Ry en las CCs de las ratas WKY. Podemos suponer que al bloquear la salida del Ca^{2+} del RE a través de los receptores de RyR (y CICR) se reclutan y fusionan vesículas de secreción más sensibles a menores niveles de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico, resultando ser vesículas más rápidas en liberar su contenido, pero contienen la misma cantidad de CA (Fig. 20 y 21). Esta idea surge al comparar la distribución de amplitud de las espigas generadas tras un pulso con alto K^+ antes y después de la incubación con Ry, donde se observó una distribución bastante similar en ambos casos, a pesar de que una disminución en el número de espigas.

En las CCs de las ratas SHR, se observó una disminución significativa en la carga acumulada, la frecuencia acumulada y el número de espigas obtenidas tras un pulso con alto K^+ después de la incubación con Ry (Fig. 18 y 19). Además, los valores de carga y amplitud promedio fueron menores después de la incubación con Ry, no así para la duración media ($t_{1/2}$) que fue similar antes y después de la incubación con Ry (Fig. 20 y 21). La distribución de la amplitud máxima de las espigas después de la incubación con Ry predominó en rangos menores a 124 pA en las CCs de las ratas SHR.

Por lo tanto, estos datos apoyan y resaltan la importancia de la participación de la salida de Ca^{2+} del RE a través de los RyR (mediante la amplificación de la señal de Ca^{2+} por CICR) en la hipersecreción de CA en las CCs de las ratas SHR. Sin embargo, este no es el único mecanismo que podría estar implicado. Un desbalance en la recaptura o remoción de Ca^{2+} del citosol también podría prolongar la señal de Ca^{2+} desencadenando en una mayor exocitosis de CA en las CCs de las ratas SHR. Recientemente, Li *et al.*, 2012 reportaron alteraciones en la capacidad de amortiguamiento y liberación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria en neuronas en cultivo del ganglio simpático cervical superior proveniente de ratas SHR pre-hipertensas la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico disminuyera más lentamente. La participación de la mitocondria y la ATPasa de Ca^{2+} del RE (que internaliza Ca^{2+} del citosol hacia RE) podrían participar en la homeostasis y regulación de la señal de Ca^{2+} influyendo en la exocitosis de las CA en las CCs. El papel que podría jugar éstos en la liberación de CA quedan fuera del alcance de este estudio, sin embargo, sería temas interesantes a abordar en futuras investigaciones.

Finalmente, algo novedoso en nuestro estudio fue que mediante el uso de la técnica de amperometría se logró cuantificar y analizar con gran resolución espacio-temporal, la dinámica de liberación de CA de las CCs para las ratas WKY y SHR. Después de las distintas estrategias experimentales y como resultado de las posibles alteraciones en la dinámica y homeostasis del

[Ca²⁺]_i en las CCs para ambas cepas, se analizó el resultado final, es decir, la exocitosis de las CA de las vesículas de secreción, lo cual no había sido examinado hasta ahora. Aún no tenemos evidencias contundentes que nos permitan extrapolar estos resultados a lo que ocurre en la génesis y en la primera fase de la hipertensión arterial esencial en los seres humanos, sin embargo, es muy probable que las alteraciones presentes en las ratas SHR estén presentes en los pacientes hipertensos.

Por último, los resultados de este estudio son importantes ya que contribuyen a entender el rompecabezas de todas las alteraciones posibles detrás de la patogénesis de la hipertensión arterial esencial, además amplían las posibilidades y abren la puerta al desarrollo e identificación de nuevos blancos terapéuticos que influyan positivamente en una mejor esperanza de vida en los pacientes hipertensos.

IX. CONCLUSIONES

1. Las CCs adrenales de las ratas SHR presentaron un mayor porcentaje de células con liberación espontánea de CA, sin embargo, la cantidad de CA liberadas fue similar entre las CCs adrenales de las ratas SHR y las ratas WKY en la etapa inicial de la hipertensión arterial esencial.
2. La cantidad de CA liberadas en las CCs adrenales de ratas SHR tras despolarización con alto K^+ (60 mM) fue mayor en comparación con las CCS adrenales de las ratas WKY.
3. La salida del Ca^{2+} del RE inducida con cafeína (10 mM) generó una mayor liberación de CA en las CCs adrenales de las ratas SHR en comparación con las de las ratas WKY.
4. El vaciamiento del Ca^{2+} del RE inducida con cafeína (10 mM) favoreció el reclutamiento de vesículas de secreción con un mayor contenido de CA en comparación a la despolarización con K^+ (60 mM) en las CCs adrenales SHR y WKY.
5. El bloqueo específico de la salida de Ca^{2+} del RE a través de los RyR (Ry 10 μ M) disminuyó la liberación de CA en las CCs adrenales de las ratas SHR en comparación con las de las ratas WKY.
6. La liberación de Ca^{2+} del RE (mediante la amplificación de la señal de Ca^{2+} por CICR) tiene una mayor participación en la secreción de CA en las CCs adrenales de las ratas SHR.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, García AG, García-Sancho J, Montero M, Alvarez J. (1999) Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol.* 1999 Ene 25;144(2):241-54.
- Alonso MT, Montero M, Carnicero E, García-Sancho J, Alvarez J. (2002) Subcellular Ca^{2+} dynamics measured with targeted aequorin in chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci.* Oct;971:634-40.
- Alvarez J.(2012) Calcium dynamics in the secretory granules of neuroendocrine cells. *Cell Calcium.* Mar-Abr; 51(3-4):331-7.
- Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, Mark AL. (1989) Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension.* Aug;14(2):177-83.
- Angleton JK, Betz WJ. (1997) Monitoring secretion in real time: capacitance, amperometry and fluorescence compared. *Trends Neurosci.* Jul;20(7):281-7.
- Antonaccio MJ, Kerwin L. (1981) Pre- and postjunctional inhibition of vascular sympathetic function by captopril in SHR. Implication of vascular angiotensin II in hypertension and antihypertensive actions of captopril. *Hypertension.* 1981 May-Jun;3(3 Pt 2):154-62.
- Artalejo AR. (1995) "*Electrical Properties of Adrenal Chromaffin Cells*". En: *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells*. Scherübl H y Hescheler J Editores. CRC press.
- Atanur SS, Birol I, Guryev V, Hirst M, Hummel O, Morrissey C, Behmoaras J, Fernandez-Suarez XM, Johnson MD, McLaren WM, Patone G, Petretto E, Plessy C, Rockland KS, Rockland C, Saar K, Zhao Y, Carninci P, Flicek P, Kurtz T, Cuppen E, Pravenec M, Hubner N, Jones SJ, Birney E, Aitman TJ. (2010) The genome sequence of the spontaneously hypertensive rat: Analysis and functional significance. *Genome Res.* Jun;20(6):791-803.
- Augustine GJ & Neher E (1992) Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 450: 247–271.
- Berridge MJ. (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* Nov-Dec;32(5-6):235-49.
- Bi GQ, Morris RL, Liao G, Alderton JM, Scholey JM, Steinhardt RA. (1997) Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca^{2+} -regulated exocytosis. *J Cell Biol.* Sep 8;138(5):999-1008.
- Borges R, Camacho M and Gillis KD. (2008) Measuring secretion in chromaffin cells using electrophysiological and electrochemical methods. *Acta Physiol.* 192: 173-184.
- Borkowski KR, Quinn P.(1983) The effect of bilateral adrenal demedullation on vascular reactivity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* Nov;80(3):429-37.
- Boron W. F., Boulpaep E. L. (2008a) "*The Autonomic Nervous System*". En: *Medical Physiology*, 2ª. Ed. Elsevier-Saunders, Philadelphia, EUA.
- Boron W. F., Boulpaep E. L. (2008b) "*The Adrenal Gland*". En: *Medical Physiology*, 2ª. Ed. Elsevier-Saunders, Philadelphia, EUA.

- Boksa P. (1990) Dopamine release from bovine adrenal medullary cells in culture. *J Auton Nerv Syst.* Apr;30(1):63-74.
- Bruns D. (2004); Detection of transmitter release with carbon fiber electrodes. *Methods,* Ago;33(4):312-21.
- Cannon, W.B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 9, 399-431.
- Camacho M, Montesinos MS, Machado JD, Borges R. (2003) Exocytosis as the mechanism for neural communication. A view from chromaffin cells. *Rev Neurol.* Feb 15-28;36(4):355-60.
- Campos-Nonato I, Hernández-Barrera L, Rojas-Martínez R, Pedroza-Tobías A, Medina-García C, Barquera S. Hypertension: prevalence, early diagnosis, control and trends in Mexican adults. *Salud Publica Mex* 2013;55 supl 2:S144-S150.
- Chow RH & von Rüden L. (1995) "*Electrochemical detection of secretion from single cells*". En: *Single-channel recording* (eds. Sakmann B & Neher E). 245 – 276 (Plenum Press, New York
- Chow RH, von Rüden L, Neher E. (1992) Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature,* Mar 5;356(6364):60-3.
- Coupland RE. (1989) The natural history of the chromaffin cell—twentyfive years on the beginning. *Arch Histol Cytol* 52 Suppl: 331–341.
- Coupland, R.E. (1965). *The Natural History of the Chromaffin Cell*, pp. 47–76. Longmans, Green & Co Ltd, London.
- Crivellato E, Nico B, Ribatti D. (2008) The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec (Hoboken).* Dic;291(12):1587-602.
- Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, Aldea M, Arroyo G, Fuentealba J, Garcia AG. (2002) Calcium entry, calcium redistribution, and exocytosis. *Ann N Y Acad Sci.* Oct;971:108-16.
- Currie G, Freel EM, Perry CG, Dominiczak AF. (2012) Disorders of blood pressure regulation-role of catecholamine biosynthesis, release, and metabolism. *Curr Hypertens Rep.* Feb;14(1):38-45.
- Dampney R.A., Coleman M.J., Fontes M.A., Hirooka Y., Horiuchi J., Li Y.W., Polson J.W., Potts P.D., Tagawa T. (2002) Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29: 261-268, 2002.
- D'Andrea P, Thorn P. (1996) Ca²⁺ signalling in rat chromaffin cells: interplay between Ca²⁺ release from intracellular stores and membrane potential. *Cell Calcium.* Feb;19(2):113-23.
- De Champlain J, Farley L, Cousineau D, van Ameringen MR. (1976) Circulating catecholamine levels in human and experimental hypertension. *Circ Res.* Feb;38(2):109-14.
- De Diego AM, Gandía L, García AG. (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf).* Feb;192(2):287-301.

- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, Borges R. (2008) Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*. Feb;192(2):145-63. Epub 2007 Nov 16.
- Domínguez N, Rodríguez M, Machado JD, Borges R. (2012) Preparation and culture of adrenal chromaffin cells. *Methods Mol Biol*. 846:223-34.
- Dornas WC, Silva ME.(2011) Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci. Sep*;36(4):731-7.
- Douglas W W. (1968) Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34: 451-474.
- Douglas WW & Poisner AM. (1962) On the mode of action of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion: increased uptake of calcium during the secretory response. *J Physiol* 162: 385-392.
- Douglas WW & Rubin RP. (1961a)The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40–57.
- Douglas WW & Rubin RP. (1961b). Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature* 192: 1087-1089.
- Douglas WW. (1968).Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34: 451-474,
- Duncan RR, Greaves J, Wiegand UK, Matskevich I, Bodammer G, Apps DK, Shipston MJ, Chow RH. (2003) Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature*. Mar 13;422(6928):176-80.
- Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. (1970) Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*. Oct 3;228(5266):34-6.
- Fabiato A. (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. Jul;245(1):C1-14.
- Fauci AS., Braunwald E., Kasper D. L., Hauser SL, Longo DL, J. Jameson L., Loscalzo J, (2009) “*Enfermedad vascular hipertensiva*”. En: Harrison Principios de Medicina Interna, 17ª. Edición, Mc Graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México D. F.
- Fenwick EM, Marty A, Neher E. (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 331:577–597.
- Fernández-Chacón R, Alvarez de Toledo G. (1995) Cytosolic calcium facilitates release of secretory products after exocytotic vesicle fusion. *FEBS Lett*. Abr 24;363(3):221-5.
- Fernández-Chacón R, Shin OH, Königstorfer A, Matos MF, Meyer AC, Garcia J, Gerber SH, Rizo J, Südhof TC, Rosenmund C.(2002) Structure/function analysis of Ca²⁺ binding to the C2A domain of synaptotagmin 1. *J Neurosci*. Oct 1;22(19):8438-46.
- Fox SI. (2011a) “*Endocrine Glands: Secretion and Action Hormones*”. En: Human. Physiology, 12ª. Ed. McGraw-Hill Higher Education.
- Fox SI. (2011b) “*The Autonomic Nervous System*”. En Human. Physiology, 12ª. Ed. McGraw-Hill Higher Education, New York, EUA.

- Gandía L, Borges R, Albillos A, García AG. (1995) Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch.* May;430(1):55-63.
- García AG, Padín F, Fernández-Morales JC, Maroto M, García-Sancho J. (2012) Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium.* Mar-Abr;51(3-4):309-20.
- Goldstein DS, Horwitz D, Keiser HR, Polinsky RJ, Kopin IJ (1983) Plasma I-[3H]norepinephrine, d-[14C]norepinephrine, and d,l-[3H]isoproterenol kinetics in essential hypertension. *J Clin Invest.* Nov;72(5):1748-58.
- Goldstein DS. (1983) Plasma catecholamines and essential hypertension. An analytical review. *Hypertension.* Ene-Feb;5(1):86-99.
- Gonon F, Cespuglio R, Ponchon JL, Buda M, Jouvét M, Adams RN, Pujol JF. (1978) *In vivo* continuous electrochemical determination of dopamine release in rat neostriatum. *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.*; Abr 24; 286(16):1203-6.
- Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, Mancia G. (1998) Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension.* Jan;31(1):68-72.
- Grassi G, Quarti-Trevano F, Dell'oro R, Mancia G. (2008) Essential hypertension and the sympathetic nervous system. *Neurol Sci.* May;29 Suppl 1:S33-6.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2006a). "The *Autonomic Nervous System and the Adrenal Medulla*". En: *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed. Elsevier-Saunders, Philadelphia, EUA.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. (2006b). "*Nervous Regulation of the Circulation, and Rapid Control of Arterial Pressure*". En: *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed. Elsevier-Saunders, Philadelphia, EUA.
- Haffman, B. B. & R. J. Lefkowitz. (2006) "*Catecholamines, sympathomimetic drugs and adrenergic receptor antagonist*". En: *Goodman and Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York.
- Hassellund SS, Flaa A, Sandvik L, Kjeldsen SE, Rostrup M. (2010) Long-term stability of cardiovascular and catecholamine responses to stress tests: an 18-year follow-up study. *Hypertension.* 2010 Ene;55(1):131-6.
- Head RJ. (1989) Hypernoradrenergic innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels.*;26(1):1-20.
- Helle KB. (2000) The chromogranins. Historical perspective. *Adv Exp Med Biol*; 482: 3-20.
- Herring N, Lee CW, Sunderland N, Wright K, and Paterson DJ. (2011) Pravastatin normalises peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Journal Molecular and Cellular Cardiology* 50: 99-106.
- Herrington J, Park YB, Babcock DF, Hille B. (1996) Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca²⁺ loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron.* Ene;16(1):219-28.
- Hodel, A. (2001) Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol* 13, 217–221.

- Hoffman, B.B., Taylor, P. (2001) "*Neurotransmission*". En: Goodman and Gilman's: the Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York.
- Hollins B, Ikeda SR. (1996) Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol.* Ago;76(2):1195-211.
- Inoue M, Sakamoto Y, Fujishiro N, Imanaga I, Ozaki S, Prestwich GD, Warashina A. (2003) Homogeneous Ca²⁺ stores in rat adrenal chromaffin cells. *Cell Calcium* Ene;33(1):19-26.
- Jahn R, Lang T, Südhof TC. (2003) Membrane fusion. *Cell.* Feb 21;112(4):519-33.
- Jahn R, Südhof TC. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem.*;68:863-911.
- Jimenez-Pérez N, Segura-Chama P, López-Bistrain P, Pérez-Armendariz EM, Hernández-Cruz A (2013) Enhanced intracellular Ca²⁺ transients in chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats may underlie enhanced catecholamine secretion. En: 17th International Symposium on Chromaffin Cell Biology, Sección Posters (P25), Rouen-Normandía, Francia. Jul 13-17.
- Judy WV, Farrell SK. (1979) Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* Nov-Dec;1(6):605-14.
- Julius S, Krause L, Schork NJ, Mejia AD, Jones KA, van de Ven C, Johnson EH, Sekkarie MA, Kjeldsen SE, Petrin J, *et al.* (1991) Hyperkinetic borderline hypertension in Tecumseh, Michigan. *J Hypertens.* Ene;9(1):77-84.
- Kidokoro Y & Ritchie AK. (1980). Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol.* 307:199-216.
- Kidokoro, Y., Miyazaki, S. & Ozawa, S. (1982). Acetylcholine induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J Physiol (Lond)* 324, 203–220.
- K-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, de Champlain J. (1997) Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* Ago;30(2 Pt 1):278-87.
- Korner P, Bobik A, Oddie C, Friberg P. (1993) Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. *Hypertension.* Aug;22 (2):243-52.
- Kumakura K, Sasaki K, Sakurai T, Ohara-Imaizumi M, Misonou H, Nakamura S, Matsuda Y, Nonomura Y. (1994) Essential role of myosin light chain kinase in the mechanism for MgATP-dependent priming of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* Dic;14(12):7695-703.
- Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev.* Abr;89(2):535-606.
- Landsberg L, Young J B. (1992) "*Catecholamines and the adrenal medulla*". En *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th edition. Wilson J D & Foster D W. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1992.

- Lara B, Gandía L, Martínez-Sierra R, Torres A, García AG.(1998) Q-type Ca^{2+} channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflugers Arch. Mar*;435(4):472-8.
- Lara B, López MG, Villarroya M, Gandía L, Cleeman L, Morad M, García AG. (1997) A caffeine-sensitive Ca^{2+} store modulates K^{+} -evoked secretion in chromaffin cells. *Am J Physiol. Abr*;272(4 Pt 1):C1211-21.
- Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, Tsoporis J, Coughlin M. (1991) Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res. Sep*;69(3):714-21.
- Lee RM, Triggle CR, Cheung DW, Coughlin MD. (1987) Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension. Sep*;10(3):328-38.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ Jr, Near JA, Wightman RM. (1990) Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *J Biol Chem. Sep 5*;265(25):14736-7.
- Li L, Chin LS. (2003) The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. *Cell Mol Life Sci. 2003 May*;60(5):942-60.
- Li D, Lee CW, Buckler K, Parekh A, Herring N, Paterson DJ.(2012) Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. *Hypertension. Mar*;59(3):642-9.
- Lim DY, Jang SJ, Park DG. (2002) Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton Autacoid Pharmacol. Ago*;22(4):225-32.
- Lim DY, Lee JH, Kim WS, Kim SB, Lee EH, Lee BJ, Ko ST. (1991) Studies on secretion of catecholamine evoked by caffeine from the isolated perfused rat adrenal gland. *Arch Pharm Res. Mar*;14.
- Llano I, DiPolo R, Marty A. (1994) Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje cells. *Neuron. Mar*;12(3):663-73.
- Lomax RB, Michelena P, Núñez L, García-Sancho J, García AG, Montiel C. (1997) Different contributions of L- and Q-type Ca^{2+} channels to Ca^{2+} signals and secretion in chromaffin cell subtypes. *Am J Physiol. Feb*;272(2 Pt 1):C476-84.
- Lovenberg, W., Yamabe, H., De Jong, W., & Hansen, C. T. (1974). Genetic variation of the catecholamine biosynthetic enzyme activities in various strains of rats including the spontaneously hypertensive rat. *Biochemical Pharmacology*, 23, 740-744.
- Lukyanetz EA. (2001) Different secretory vesicles can be involved in depolarization-evoked exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun. Nov 9*;288(4):844-8.
- Machado JD, Camacho M, Alvarez J, Borges R. (2009) On the role of intravesicular calcium in the motion and exocytosis of secretory organelles. *Commun Integr Biol*;2(2):71-3.
- Machado DJ, Montesinos MS, Borges R. (2008) Good practices in single-cell amperometry. *Methods Mol Biol.*; 440:297-313.

- Maemura S, Niwa M, Ozaki M. (1982) Characteristic alterations in adrenal catecholamine contents in SHR, SHRSP, and WKY during development of hypertension and stroke. *Jpn Heart J*. Jul;23(4):593-602.
- Mahapatra S, Calorio C, Vandael DH, Marcantoni A, Carabelli V, Carbone E. (2012) Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium*. Mar-Apr;51(3-4):321-30.
- Majewski H, Tung LH, Rand MJ. (1981) Hypertension through adrenaline activation of prejunctional beta-adrenoceptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Sep-Oct;8(5):463-8.
- Malgaroli A, Fesce R, Meldolesi J. (1990) Spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5-trisphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca^{2+} store. *J Biol Chem*. Feb 25;265(6):3005-8.
- Meldolesi J, Pozzan T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci*. Ene;23(1):10-4.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A, García AG. (2009) Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Apr;329(1):231-40.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, de Diego AM, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A, García AG. (2008). Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *J Pharmacol Exp Ther*. Feb;324(2):685-93.
- Mitchell KJ, Pinton P, Varadi A, Tacchetti C, Ainscow EK, Pozzan T, Rizzuto R, Rutter GA. (2001) Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca^{2+} store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. *J Cell Biol*. Oct 1;155(1):41-51.
- Mosharov EV, Sulzer D. (2005) Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods*.; Sep;2(9):651-8.
- Nassar-Gentina V, Pollard HB, Rojas E. (1988) Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol*. May;254(5 Pt 1):C675-83.
- Neher E. (1998) Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*. Mar;20(3):389-99.
- Nomura Y, Asano M. (2002) Increased Ca^{2+} buffering function of sarcoplasmic reticulum in small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. Mar;25(2):231-9.
- Okamoto K, Aoki K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. Mar;27:282-93.
- O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, and Burgoyne RD. (1989) Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO J* 8: 401411.
- Pak CH. (1981) Plasma adrenaline and noradrenaline concentrations of the spontaneously hypertensive rat. *Jpn Heart J* 22: 987-995.

- Pan CY, Kao LS. (1997) Catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells: the role of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger and the intracellular Ca²⁺ pool. *J Neurochem.* Sep;69(3):1085-92.
- Perlman R, Chalfie M (1977). "Catecholamine release from the adrenal medulla" En *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th edition. Wilson J D & Foster D W. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1992.
- Perloff D, Sokolow M, Cowan RM, Juster RP. (1989) Prognostic value of ambulatory blood pressure measurements: further analyses. *J Hypertens Suppl.* May;7(3):S3-10.
- Pintérová M, Kunes J, Zicha J. (2011) Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol Res*;60(3):381-402.
- Poisner AM (1973) Caffeine-induced catecholamine secretion: similarity to caffeine-induced muscle contraction. *Proc Soc Exp Biol Med.* Ene;142.
- Ponchon JL, Cespuglio R, Gonon F, Jouvet M and Pujol JF. (1979) Normal pulse polarography with carbon fiber electrodes for *in vitro* and *in vivo* determination of catecholamines. *Anal. Chem.*; 51 (9): 1483-1486.
- Postnov YV, Orlov SN, Budnikov YY, Doroschuk AD, Postnov AY. (2007) Mitochondrial energy conversion disturbance with decrease in ATP production as a source of systemic arterial hypertension. *Pathophysiology.* Dic;14(3-4):195-204.
- Poulsen JC, Caspersen C, Mathiasen D, East JM, Tunwell RE, Lai FA, Maeda N, Mikoshiba K, Treiman M. (1995) Thapsigargin-sensitive Ca⁽²⁺⁾-ATPases account for Ca²⁺ uptake to inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca²⁺ stores in adrenal chromaffin cells. *Biochem J.* May 1;307 (Pt 3):749-58.
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev.* Jul;74(3):595-636.
- Rigual R, Montero M, Rico AJ, Prieto-Lloret J, Alonso MT, and Álvarez J. (2002) Modulation of secretion by the endoplasmic reticulum in mouse chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 16: 1690–1696.
- Schegel W & Mollard P. (1995) "*Electrical activity and stimulus-secretion coupling in neuroendocrine cells*". En: *The Electrophysiology of Neuroendocrine cells*. Scherubl H y Hescheler J. Editores, CRC press.
- Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, Krozowski Z, Campbell DJ, Lambert G, Hastings J, Aggarwal A, Esler MD. (2004) Sympathetic augmentation in hypertension: role of nerve firing, norepinephrine reuptake, and Angiotensin neuromodulation. *Hypertension.* Feb;43(2):169-75.
- Schober M, Howe PR, Sperk G, Fischer-Colbrie R, Winkler H. (1989) An increased pool of secretory hormones and peptides in adrenal medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension,* May;13(5):469-74.
- Schroeder TJ, Borges R, Finnegan JM, Pihel K, Amatore C, Wightman RM. (1996) Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophys J.* Feb;70(2):1061-8.

- Schroeder TJ, Jankowski JA, Senyshyn J, Holz RW, Wightman RM. (1994) Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture. *J Biol Chem.* Jun 24;269(25):17215-20.
- Segura F, Brioso MA, Gómez JF, Machado JD, Borges R. (2000) Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *J Neurosci Methods*; Nov 30;103(2):151-6.
- Segura-Chama P, Hernández A, Jiménez-Pérez N, Alejandre-García T, Rivera-Cerecedo CV, Hernández-Guijo J, Hernández-Cruz A. (2010) Comparison of Ca²⁺ currents of chromaffin cells from normotensive Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol.* Nov;30(8):1243-50.
- Segura-Chama PD. (2012) Estudio Electrofisiológico de la Corriente de Calcio de Células Cromafines de Ratas Hipertensas SHR y Normotensas WKY. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal.
- Singh M, Mensah GA, Bakris G. (2010) Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin.* Nov;28(4):545-59.
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE.(1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 1993 Nov 5;75(3):409-18.
- Steyer JA, Horstmann H, Almers W. (1997) Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature.* Jul 31;388(6641):474-8.
- Stokes J, Kannel WB, Wolf PA, Cupples LA, D'Agostino RB. (1987) The relative importance of selected risk factors for various manifestations of cardiovascular disease among men and women from 35 to 64 years old: 30 years of follow-up in the Framingham Study. *Circulation.* Jun;75(6 Pt 2):V65-73.
- Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. (1990) Abnormal calcium handling in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* Abr;8(4):369-75.
- Südhof TC. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* Jun 22;375(6533):645-53.
- Südhof TC. (2000) The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron.* Nov;28(2):317-20.
- Sutko JL, Airey JA, Welch W, Ruest L. (1997) The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Pharmacol Rev.* Mar;49(1):53-98.
- TerBush DR, Bittner MA, and Holz RW. (1988).Ca²⁺ influx causes rapid translocation of protein kinase C to membranes. Studies of the effects of secretagogues in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 263: 18873-18879.
- Timberlake DS, O'Connor DT, Parmer RJ. (2001) Molecular genetics of essential hypertension: recent results and emerging strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* Jan;10(1):71-9.
- Trifaró JM, Vitale ML.(1993) Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 1993 Nov;16(11):466-72.
- Tsuda K, Masuyama Y. (1991) Presynaptic regulation of neurotransmitter release in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Jul;18(7):455-67.

- Tung LH, Rand MJ, Majewski H. (1981) Adrenaline-induced hypertension in rats. *Clin Sci (Lond)*. Dic;61 Suppl 7:191s-193s.
- Udenfriend S., Bumps FM., Foster HL., Freis ED., Hansen CT., Loverberg WM., Yamori Y. (1976) *"Spontaneously Hypertensive (SHR) Rats: Guidelines for Breeding, Care and Use"*. A Report of the Committee on Care and Use of Spontaneously Hypertensive (SHR) Rats, Institute of Laboratory Animal Resources, Assembly of Life Sciences, National Research Council. Washington D.C.
- Villalobos C, Nuñez L, Montero M, García AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J, García-Sancho J.(2002) Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J*. Mar;16(3):343-53.
- Vikrant S. & Tiwari SC (2011) Essential Hypertension-Pathogenesis and Pathophysiology, *Journal of the Indian Academy of Clinical Medicine*, 2(3);140-161.
- Vitale N, Gasman S, Caumont AS, Gensse M, Galas MC, Chasserot-Golaz S, Bader MF. (2000) Insight in the exocytotic process in chromaffin cells: regulation by trimeric and monomeric G proteins. *Biochimie*. Abr;82(4):365-73.
- Vites AM, Pappano AJ. (1994) Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J Pharmacol Exp Ther*. Mar;268(3):1476-84.
- Vlachakis ND, Alexander N, Maronde RF. (1980) Increased plasma normetanephrine in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. Feb;2(2):309-19.
- Wallace DJ, Chen C, Marley PD. (2002) Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J Physiol*. May 1;540(Pt 3):921-39.
- Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ Jr, Viveros OH. (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.; Dic 1;88(23):10754-8.
- Yamabe H, De Jong W, Lovenberg W. (1973) Further studies on catecholamine synthesis in the spontaneously hypertensive rat: catecholamine synthesis in the central nervous system. *Eur J Pharmacol*. Apr;22(1):91-8.
- Yamamoto H, Okuzaki D, Yamanishi K, Xu Y, Watanabe Y, Yoshida M, Yamashita A, Goto N, Nishiguchi S, Shimada K, Nojima H, Yasunaga T, Okamura H, Matsunaga H, Yamanishi H. (2013) Genetic analysis of genes causing hypertension and stroke in spontaneously hypertensive rats. *Int J Mol Med*. 2013 May;31(5):1057-65.
- Yang DM & Kao LS (2001) Relative contribution of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger, mitochondria and endoplasmic reticulum in the regulation of cytosolic Ca^{2+} and catecholamine secretion of bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*. Ene;76(1):210-6.
- Young WF. (2003) *"Endocrine hypertension"*. En: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, *et al.*, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*, 10th ed. Philadelphia, PA: Saunders.
- Zhou Z, Mislisler S. (1995) Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem*. Feb 24;270(8):3498-505.
- Zicha J, Kunes J. (1999) Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev*. Oct;79(4):1227-82.