



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**PARTICIPACIÓN DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO EN LA
DINÁMICA DE CALCIO INTRACELULAR Y EXOCITOSIS DE
CATECOLAMINAS EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATAS
HIPERTENSAS Y NORMOTENSAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

OSCAR JAVIER PARADA PARRA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR — UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. AGUSTÍN GUERRERO HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA — CINVESTAV

DR. KARLEN GAZARIAN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS — UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX. México. Marzo de 2025



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.

A mi padre.

Agradecimientos

Agradezco a mis familiares: a mi padre, a mi madre, a mis hermanos y sobrinos; con su aliento y motivación en la distancia hicieron parte importante del desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Arturo Hernández—Cruz por aceptarme para desarrollar este trabajo en su laboratorio. A la beca CONAHCyT por asegurarme un sustento económico y al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo administrativo y académico.

A los compañeros de laboratorio Pedro Segura por las enseñanzas en amperometría, Hilda Angélica por el apoyo emocional y su amistad incondicional, Claudia Sánchez por sus consejos académicos y a Jacob García por la estrategia para optimizar los cultivos de células cromafines adrenales de rata.

A Monique por la motivación, el soporte emocional y sus sabios consejos que me permitieron continuar con el propósito de culminar esta investigación.

A la Dra. Claudia Rivera por el mantenimiento y reproducción de la colonia de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y Wistar Kyoto normotensas (WKY). A la técnica académica Diana Millán por la ayuda en la obtención de células cromafines adrenales de bovino.

Al pueblo de México por brindar parte de sus impuestos a la formación académica del recurso humano para Latinoamérica, y por acogerme en su seno con su cultura, costumbres, gastronomía e idiosincrasia.

Tabla de Contenido

Lista de Figuras	10
Lista de Tablas	12
Lista de Símbolos y Abreviaturas	13
Resumen	17
I. Introducción	19
II. Marco teórico	25
Capítulo 1	25
1. Las glándulas adrenales	25
1.1 Localización, morfología y estructura de la glándula adrenal.....	26
1.2 Anatomía fisiológica de la glándula adrenal de mamífero	28
Capítulo 2	38
2. Las células cromafines adrenales.....	38
2.1 Síntesis, almacenamiento y exocitosis de catecolaminas.....	39
2.2 Acoplamiento estímulo–secreción y la función del Ca^{2+}	46
2.3 Eliminación de EPI y NE del espacio extracelular	55
Capítulo 3	56
3. Evidencia de una hipersecreción de CAs en la hipertensión arterial	56
3.1 La hipertensión arterial	56
3.2 El modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR)	59
III. Planteamiento del problema y preguntas de investigación	61
IV. Justificación	63
V. Objetivos	65
General.....	65
Específicos	65
VI. Hipótesis	66
VII. Materiales y métodos	67
Animales.....	67
Preparación de cultivo primario de células cromafines adrenales de rata y bovino	67
Registro de la exocitosis de CAs de CCs adrenales de rata y bovino mediante amperometría manual de célula única	68

Registro en tiempo real de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en CCs adrenales de rata y bovino mediante microscopía de fluorescencia	71
Registro simultáneo de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs en CCs adrenales de rata individuales	73
Análisis de datos y estadística	73
VIII. Resultados.....	75
Efecto de una despolarización repetitiva sobre la exocitosis de CAs de CCs de ratas hipertensas SHR y normotensas WKY	75
¿Cómo afecta a la exocitosis de CAs de CCs de ratas WKY y SHR la aplicación de CPA?	77
¿El CPA afecta la exocitosis de CCs de rata de la misma manera que la exocitosis de las CCs de ratón o de las CCs de bovino?	80
Efecto de despolarizaciones recurrentes sobre los transitorios de Ca^{2+} de CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR bajo condiciones control	81
Identificación de varios componentes en los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ causados por despolarización en CCs de rata	84
Comparación del efecto de la aplicación de CPA sobre los $t-[Ca^{2+}]$ de CCs de ratas WKY normotensas y SHR hipertensas	85
Efecto de la aplicación de CPA sobre las CCs de bovino	89
Efecto de la aplicación de rianodina sobre los parámetros cinéticos de los $t-[Ca^{2+}]$ de las CCs de rata.....	90
Registro simultáneo de señales de Ca^{2+} y espigas amperométricas en CCs individuales.....	94
Efecto de la aplicación de CPA en el registro simultáneo de señales de Ca^{2+} y espigas amperométricas en una misma CC	96
XIX. Discusión	99
Dinámica de la exocitosis de CAs durante de la estimulación repetitiva de CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR bajo condiciones control	100
Efecto del CPA sobre la exocitosis de CAs en CCs de ratas WKY y SHR	103
Registros de señales de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización repetitiva en CCs de ratas SHR y WKY bajo condiciones control	108
Efecto de la aplicación de CPA y rianodina sobre los $t-[Ca^{2+}]$ en CCs de ratas SHR y WKY	110
Registro simultáneo de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs en CCs individuales .	116
Registro simultáneo de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs en CCs individuales antes, durante y después de la aplicación de CPA.....	119

Posible explicación fisiológica de los t—[Ca ²⁺] con uno o dos componentes en las CCs de rata	123
X. Conclusiones	128
XI. Referencias.....	129
XII. Material suplementario.....	147

Lista de Figuras

Figura 1. Las glándulas adrenales de la rata.	28
Figura 2. Cortes transversales de las glándulas adrenales de distintas especies de mamífero	29
Figura 3. Zonación de la glándula adrenal	31
Figura 4. La médula adrenal y las células cromafines.....	32
Figura 5. Inervación de la médula adrenal	36
Figura 6. Proceso de síntesis enzimática de catecolaminas en las células cromafines adrenales	40
Figura 7. El gránulo cromafín (GCC).....	42
Figura 8. Proceso de exocitosis de catecolaminas en células cromafines adrenales	45
Figura 9. Densidad de corrientes de Ca^{2+} activadas por voltaje en células cromafines de distintas especies de mamífero	48
Figura 10. Componentes de la "triada funcional" de manejo de $[Ca^{2+}]_i$ en las células cromafines	50
Figura 11. Efecto del cpa sobre la exocitosis de catecolaminas y las señales de $[Ca^{2+}]_i$ de células cromafines de ratón y de bovino.....	54
Figura 12. Célula cromafín individual bajo registro amperométrico.....	70
Figura 13. Sistema de perfusión y estimulación de las células cromafines.....	71
Figura 14. Registros amperométricos de exocitosis de catecolaminas activada por despolarización en células cromafines de ratas WKY y SHR no tratadas.....	77
Figura 15. Efecto del CPA sobre la exocitosis recurrente de catecolaminas en células cromafines de ratas WKY y SHR	80
Figura 16. Señales de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por despolarizaciones repetitivas de células cromafines de ratas WKY y SHR bajo condiciones control.....	82
Figura 17. Cambios en el ancho medio y el área normalizada de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ de células cromafines de ratas WKY y SHR sometidas a despolarizaciones repetitivas	84
Figura 18. Efecto del CPA sobre los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a estímulos despolarizantes en células cromafines de rata	86
Figura 19. Efecto del CPA sobre el ancho a la mitad y el área normalizada de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por despolarización en células cromafines de ratas WKY y SHR	87
Figura 20. Efecto del cpa sobre la respuesta amperométrica y las señales de $[Ca^{2+}]_i$ en células cromafines de bovino.	90
Figura 21. Efecto de la rianodina y la cafeína sobre las señales de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por voltaje	92
Figura 22. Efecto de la rianodina sobre la duración media y el área normalizada de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por voltaje en células cromafines.....	94
Figura 23. Registro simultáneo de señales de $[Ca^{2+}]_i$ y exocitosis de catecolaminas en células cromafines individuales de rata	95
Figura 24. Registro simultáneo de señales de $[Ca^{2+}]_i$ y exocitosis de catecolaminas en CCs individuales antes, durante y después de la aplicación de CPA.....	98
Figura 25. Modelo de movilización de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por despolarización en CCs de rata.	123

Figura S1. Registros representativos de $t-[Ca^{2+}]$ bifásicos y monofásicos en CCs de ratas WKY y SHR	147
Figura S2. Reducción de la anchura media de los $t-[Ca^{2+}]$ de CCs de ratas SHR y WKY por CPA	148
Figura S3. El CPA reduce la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]$ de CCs de ratas SHR y WKY.....	148

Lista de Tablas

Tabla 1. Clasificación de la hta de acuerdo con la unión nacional para la prevención, detección, evaluación y tratamiento de la HTA—VII (JNC—VII).	57
Tabla 2. Decaimiento de la exocitosis de catecolaminas en células cromafines de ratas WKY y SHR durante la estimulación repetitiva	76
Tabla 3. Inhibición de la exocitosis estimulada de catecolaminas por CPA en células cromafines de ratas WKY y SHR	79
Tabla 4. Decaimiento de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ en células cromafines no tratadas de ratas WKY y SHR sometidas a estimulación repetitiva	83
Tabla 5. Inhibición de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ por CPA en células cromafines de ratas WKY y SHR..	88

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
°C	grados Celsius
µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micrómetros
µM	micromolar
µm	micrómetros
Ca ²⁺	catión calcio
C _m	capacitancia de la membrana
cm ²	centímetros cuadrados
H ⁺	protón
I _m	corriente de membrana
K ⁺	catión potasio
Li ⁺	catión litio
mL	mililitros
mM	miliMolar
mOsm	miliOsmol
mV	miliVoltios
Na ⁺	catión sodio
nm	nanómetros
pA	picoamperio
pH	potencial de hidrógeno
s	segundo
t	tiempo
V _m	potencial de membrana

Abreviaturas

Abreviatura	Término
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración intracelular (citoplasmática) de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]_{RE}$	Concentración de Ca^{2+} del retículo endoplásmico
AAAD	Enzima L—DOPA descarboxilasa
ACh	Acetilcolina
ATP	Adenosín trifosfato
cAMP	AMP cíclico
CAs	Catecolaminas
CaVs	Canales de Ca^{2+} operados por voltaje
CC	Célula cromafín
CCB	Célula cromafín de bovino
CCCP	Cianuro de carbonilo m-(cloro) fenilhidrazona
CCM	Célula cromafín de ratón
CICR	Liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+}
Cg A; Cg B	Cromogranina A; Cromogranina B
CM	Cardiomiocito
COMT	Enzima catecol O—metiltransferasa
CPA	Ácido ciclopiazónico
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
D β H	Enzima dopamina β —hidroxilasa
EPI	Epinefrina; adrenalina
FC	Frecuencia cardíaca
FCCP	Cianuro de carbonilo p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
GC	Gasto cardíaco
GCC	Gránulos de secreción de células cromafines
HCMD	Microdominio de alto $[Ca^{2+}]_i$
HTA	Hipertensión arterial
HW	Ancho a la mitad de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$
IP3	Inositol 1,4,5—trifosfato
IP3R	Receptor del inositol 1,4,5—trifosfato
LCMD	Microdominio de bajo $[Ca^{2+}]_i$
mAChR	Receptor de acetilcolina muscarínico

Abreviatura	Término
MAO	Enzima oxidasa de monoaminas
MCU	Transportador uniportador de Ca ²⁺ mitocondrial
MN	Metanefrina
MP	Membrana plasmática
NA	Área normalizada de los transitorios de [Ca ²⁺] _i
nAChR	Receptor de acetilcolina nicotínico
NCLX	Intercambiador sodio—calcio—litio
NE	Norepinefrina; noradrenalina
NMN	Normetanefrina
NSpost	Neurona simpática postganglionar
NSpre	Neurona simpática preganglionar
PA	Presión arterial
PACAP	polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5—bifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PLL	<i>Pool</i> de gránulos cromafines listo para liberarse
PMCA	Bomba de Ca ²⁺ de la membrana plasmática
PNMT	Enzima feniletanolamina N—metiltransferasa
PR	<i>Pool</i> de gránulos cromafines de reserva
RAPG	Receptor acoplado a proteína G
RE	Retículo endoplásmico
RTG	Red trans-Golgi
RVP	Resistencia vascular periférica
Ry	Rianodina
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Bomba de Ca ²⁺ del retículo sarco/endoplásmico
SN	Sistema nervioso
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNS	Sistema nervioso simpático

Abreviatura	Término
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
t-[Ca ²⁺]	Transitorio intracelular (citoplásmico) de Ca ²⁺
TF	Triada funcional
TH	Enzima tirosina hidroxilasa
VMAT	Transportador de monoaminas vesicular
Vmit	Potencial de membrana mitocondrial
VNUT	Transportador de nucleótidos vesicular
VS	Volumen sistólico
WKY	Rata Wistar Kyoto normotensa

Resumen

La movilización intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la exocitosis de catecolaminas (CAs) de las células cromafines (CCs) adrenales difiere entre las distintas especies de mamíferos. Estas diferencias se deben, en parte, a la contribución diferencial del mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) desde depósitos intracelulares, el cual amplifica las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La inhibición transitoria de la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA) por ácido ciclopiazónico (CPA) reduce la magnitud del mecanismo de CICR. En un estudio reciente publicado por Martínez—Ramírez et al. (2020) se mostró que el CPA tiene efectos opuestos sobre la liberación de CAs en CCs de ratón (*Mus musculus*, cepa C57BL/6J) y de bovino (*Bos taurus*), en donde su aplicación *potencia o inhibe* la exocitosis, respectivamente. Tras retirar el CPA, la secreción disminuye en CCs de ratón e incrementa en CCs de bovino. Estas diferencias se explican si se considera que las CCs de ratón poseen un débil mecanismo de CICR y una fuerte captación de Ca^{2+} . Lo opuesto ocurriría en las CCs de bovino. Sorpresivamente, el CPA redujo tan solo un poco la amplitud de las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tanto en CCs de ratón como en CCs de bovino tras la despolarización.

En este trabajo se examina el efecto del CPA sobre la exocitosis estimulada de CAs y las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CCs de ratas (*Rattus norvegicus*), e investigamos si existe alguna diferencia en la respuesta de las CCs entre ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas normotensas (WKY), las cuales difieren en la ganancia del mecanismo de CICR. Nuestros resultados demuestran que la aplicación de CPA inhibe fuertemente la exocitosis estimulada de CAs y las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CCs de rata, independientemente de la cepa de la que provengan (SHR o WKY). De manera que, a pesar de la enorme distancia filogenética con su ancestro común más cercano, la supresión de la captación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del retículo endoplásmico (RE) por medio de CPA inhibe la secreción de CAs en CCs de rata de una forma similar a como ocurre en CCs de bovino y diferente a lo que sucede con las CCs de ratón; lo que devela relaciones evolutivas divergentes en el mecanismo de exocitosis de CAs entre roedores. Agentes farmacológicos que inhiben a la bomba SERCA, como el CPA, que suprimen la liberación de CAs en igual magnitud en CCs de ratas SHR y ratas WKY podrían no tener un efecto terapéutico en la hipertensión. Las CCs de rata presentan señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de diferente anchura (duración) y algunas incluso muestran un componente temprano y otro tardío con distintas características cinéticas. El estrechamiento de las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por CPA y rianodina sugieren que el componente tardío es debido principalmente al mecanismo de CICR. Registros simultáneos de señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y exocitosis de CAs por amperometría en las CCs revelan la existencia de una correlación robusta y predecible entre la cinética de la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la velocidad de secreción de CAs al nivel de células individuales.

Palabras clave:

Secreción de catecolaminas, calcio intracelular, médula adrenal, célula cromafín, hipertensión, rianodina, ácido ciclopiazónico, ratas WKY, ratas SHR.

I. Introducción

La señalización de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de catecolaminas (CAs) es substancialmente diferente en las células cromafines (CCs) adrenales de distintas especies de mamíferos [66] [67] [75] [85]. Durante las últimas dos décadas, una serie de estudios funcionales comparativos entre CCs de ratón (CCM) (*Mus musculus*) y CCs de bovino (CCB) (*Bos taurus*) [89] [91] han revelado diferencias significativas en los mecanismos que regulan la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción de CAs en las CCs adrenales de estas especies. Estas diferencias funcionales probablemente representan adaptaciones evolutivas de las respuestas autonómicas al estrés, sin embargo, una comparación similar entre ratones y ratas (*Rattus norvegicus*) no se ha establecido aún quizá porque se asume que estas especies tienen una relación evolutiva más cercana.

Hace poco menos de un siglo que se sabe que la exocitosis de CAs en las CCs requiere un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [63]. Actualmente, se ha evidenciado que las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultan de la suma de: i. la entrada de Ca^{2+} a la célula por medio de canales iónicos de Ca^{2+} operados por voltaje (CaVs) y la actividad de transportadores ubicados en la membrana plasmática; y, ii) la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares del ión. La mitocondria y el retículo endoplásmico (RE) son los principales reservorios de Ca^{2+} intracelular. El flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la mitocondria lo realiza el transportador uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), que utiliza la fuerza electromotriz del poderoso gradiente de potencial a través de la membrana mitocondrial interna (V_{mit}) que es de unos -180 mV: cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alrededor del MCU es $> 1 \mu\text{M}$ el canal se abre y comienza el flujo de Ca^{2+} hacia la matriz mitocondrial impulsado por el gradiente de potencial. La salida de Ca^{2+} desde la mitocondria se lleva a cabo por medio del intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+} - \text{Li}^+$ (NCLX). El intercambiador aprovecha que la concentración de Na^+ $[\text{Na}^+]_i$ en el citosol es mayor que en la matriz mitocondrial y utiliza este gradiente como fuerza impulsora para extruir Ca^{2+} hacia el citosol. Aunque el NCLX en condiciones normales funciona como un extrusor de Ca^{2+} desde la mitocondria, cuando se disipa el V_{mit} este puede funcionar en modo reverso e introducir Ca^{2+} en su interior [75].

El otro organelo que contribuye a darle forma a las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el RE. En su membrana se expresa la bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), la cual ejerce un efecto amortiguador para mantener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en valores de 1×10^{-9} M [199]. Se ha reportado que el RE en CCs puede comportarse como una fuente de Ca^{2+} o como un sumidero del ión [86]. Cuando el RE se vacía, la bomba SERCA incrementa su actividad permitiendo la captación neta de Ca^{2+} desde el citosol reabasteciendo así el depósito. Por su

parte, para diversas funciones celulares específicas y complejas, el RE libera rápidamente Ca^{2+} hacia el citosol por medio de dos proteínas insertadas en su membrana: el receptor de IP3 (IP3R) y el receptor de rianodina (RyR) [200] [201] [206] [207]. Tras su activación por una proteína G, la fosfolipasa C rompe en la membrana plasmática al fosfatidil inositol 4,5—bifosfato (PIP2) para producir diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5—trifosfato (IP3) [202] [203] [204]. El IP3, que es soluble en el citosol, alcanza a su receptor en la membrana de RE y lo activa permitiendo la liberación rápida de Ca^{2+} desde el reservorio. En cuanto al RyR, este es activado desde su cara citosólica por la unión de Ca^{2+} . Este estímulo hace que el canal se abra y permita la salida rápida del ión a favor de su gradiente. En ambos casos, el Ca^{2+} impulsa un ciclo autosostenible que es el fundamento de lo que se conoce como la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). La regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por parte del RE en condiciones de reposo o excitación de la CC puede entenderse como un balance entre la actividad de captación de Ca^{2+} por la bomba SERCA y la actividad de liberación o fuga de Ca^{2+} a través de los RyR.

En condiciones de reposo, la captación de Ca^{2+} es en promedio igual a su fuga en todo el RE y el intercambio neto es cero. Cuando la célula es activada por un estímulo, el incremento inicial de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la entrada del ión a través de los CaVs es amplificado por la liberación neta de más Ca^{2+} mediante los RyR por el mecanismo de CICR en regiones puntuales del RE; sin que ello signifique que SERCA haya cesado la captación de Ca^{2+} en regiones lejanas al sitio en el que se está liberando [85]. Cuando ha pasado el estímulo y el RE se ha vaciado de Ca^{2+} , la actividad de captación de Ca^{2+} de la bomba SERCA se sobrepone a la fuga del ión y, entonces, el organelo es reabastecido hasta volver a su condición de reposo. Esta movilización neta de Ca^{2+} por parte del RE es regulada por la cantidad basal de Ca^{2+} presente en su interior ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) y tiene la capacidad de *deprimir* o *potenciar* las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ cuando una CC es estimulada: cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ es baja el RE se comporta como un *sumidero* de Ca^{2+} que disminuye la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$; por el contrario, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ es alta el RE se comporta como una *fuentes* de Ca^{2+} que amplifica la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por medio del mecanismo de CICR [174] [115].

La acción conjunta de la membrana plasmática con los CaVs; el RE con los RyRs y la bomba SERCA; y la mitocondria con el MCU y el SCLX, conforman lo que se ha denominado la “triada funcional” (TF) del manejo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las CCs. La TF les da forma a las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que gatillan la exocitosis de CAs en las CCs y la contribución específica de cada uno de sus componentes es diferente en función de la especie de mamífero de la cual procedan las células [67] [75] [85]. Un par de casos de particular interés lo representan las CCs de ratón (CCM) y las CCs de bovino (CCB).

Se ha observado que la activación de las CCs por un estímulo despolarizante de la membrana plasmática, la exocitosis de CAs de estas células es similar en ratón y en bovino,

aunque las señales de $[Ca^{2+}]_i$ son más duraderas y robustas en las CCB que en las CCM [89]. No obstante, cuando se emplean fármacos para evaluar la contribución que tienen la mitocondria y el RE en la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ de las CCs se han evidenciado respuestas diametralmente opuestas en una y otra especie. Por ejemplo, la aplicación de los protonóforos cianuro de carbonilo m-(cloro) fenilhidrazona (CCCP) y del cianuro de carbonilo p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), al disipar el V_{mit} , deberían detener la captación de Ca^{2+} por el MCU, con la consecuente elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. No obstante, en CCM tratadas con CCCP se observa una caída del 51% en la respuesta secretora y una disminución correspondiente del 48% de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ probablemente por la actividad en modo reverso del NCLX tras la disipación del V_{mit} . Por el contrario, cuando las CCB se exponen a CCCP, se observa un incremento significativo en la respuesta secretora y un aumento tanto en la amplitud como el curso temporal de la señal de $[Ca^{2+}]_i$. Estas disparidades en el manejo de $[Ca^{2+}]_i$ al bloquear la respuesta al Ca^{2+} de la mitocondria sugieren que este organelo tiene diferente función en el control de la dinámica de la $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs en las CCs entre una especie y la otra [89].

En un estudio reciente realizado por Martínez—Ramírez et al. [91] se comparó el efecto de la inhibición reversible por ácido ciclopiazónico (CPA) de la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE sobre la exocitosis de CAs y las señales de $[Ca^{2+}]_i$ generadas por una breve aplicación de acetilcolina (ACh) en CCs de ratón y de bovino. En presencia de CPA, la exocitosis de CAs incrementó en CCM pero disminuyó en CCB. Paradójicamente, las señales de $[Ca^{2+}]_i$ solo se redujeron un poco en las CCs de ambas especies. La pregunta inmediata es, ¿por qué el bloqueo reversible de SERCA causa respuestas opuestas en la exocitosis de CAs en las CCs de estas dos especies? Una hipótesis razonable es que el manejo de $[Ca^{2+}]_i$ por el RE difiere en las CCs de una y otra especie: en CCM la captación de $[Ca^{2+}]_i$ es más fuerte que su liberación al citosol, mientras que en CCB ocurriría lo contrario, esto es, la captación de $[Ca^{2+}]_i$ sería muy débil mientras que su liberación sería fuerte, poniendo de manifiesto un mecanismo de CICR más potente. Ahora bien, hay dos factores en el estudio de Martínez—Ramírez et al. que merecen ser discutidos: i) emplean acetilcolina (ACh) para estimular repetitivamente a las células; y, ii) aunque el CPA potencia la secreción de CAs en CCM y la deprime en CCB, sorprendentemente la señal de $[Ca^{2+}]_i$ tan solo disminuye un poco en ambos grupos [91].

Por una parte, el uso del agonista (ACh) para estimular repetidamente a las CCs produce la inevitable desensibilización de los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR) de estas células y, además, promueve la activación no deseada de segundos mensajeros en las vías de señalización de cada receptor [77] [78]. Por otro lado, la pobre correspondencia entre la secreción de CAs y la amplitud de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ subyacentes probablemente se deba al uso de Fura—2, un indicador fluorescente de Ca^{2+} de

alta afinidad que se ha evidenciado que interfiere con el mecanismo de CICR [124], lo que resulta de suma relevancia en el contexto de su estudio.

Además de su importancia en las CCM y las CCB, el estudio del mecanismo de CICR en CCs es de particular importancia en ratas y, específicamente, en la rata espontáneamente hipertensa (SHR), un modelo de hipertensión arterial (HTA) ampliamente estudiado desde su obtención en la década de los 60s del siglo pasado y con el que se ha buscado desentrañar los complejos mecanismos que subyacen a la fisiopatología hipertensiva [99]. Al igual que en el humano, la rata SHR desarrolla la HTA esencial con la edad: alrededor de las semanas 6 a 9, su presión arterial (PA) oscila alrededor de los 150 mm Hg y para la semana 12—15 puede alcanzar los 200 mm Hg, manteniéndose crónicamente, lo que normalmente disminuye su esperanza de vida [98]. Los descendientes normotensos de la misma cepa, las ratas Wistar Kyoto (WKY), se mantienen normotensas y se emplean como grupo control.

Se ha evidenciado que las CCs de ratas SHR presentan un mayor número de eventos de liberación ante un estímulo despolarizante, con gránulos de secreción cromafines (GCCs) de mayor tamaño y más contenido cuántico de CAs que las CCs de su contraparte WKY de la misma edad. En el estudio de Segura—Chama et al. [104] también se encontró que este fenotipo hipersecretor de CAs en las CCs de ratas SHR está acompañado de una señal de $[Ca^{2+}]_i$ más grande que se debe a un mecanismo de CICR exacerbado. Sin embargo, estos hallazgos en la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs se han realizado en CCs activadas con un estímulo despolarizante único y, además, la contribución del RE se ha evaluado en condiciones “estáticas”, es decir, mediante el empleo de tratamientos farmacológicos de acción irreversible con rianodina (Ry) en dosis altas (20 μ M) y por tiempo prolongado (> 10 min) o con cocteles de drogas agresivos (rianodina + tapsigargina + cafeína) que dejan fuera de combate al organelo sin la oportunidad de recuperarse, como ocurriría de otra manera en un escenario fisiológico. Otra limitante de este estudio, y también del estudio de Martínez—Ramírez et al. [91], es que la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de CAs se ha medido por separado en las CCs, esto es, se miden señales de $[Ca^{2+}]_i$ en unas células y la liberación de CAs en otras células del mismo cultivo, siendo que son procesos que ocurren al mismo tiempo en la misma célula y que merece la pena estudiar simultáneamente.

La presente investigación tiene dos propósitos fundamentales. El primero es determinar si el reservorio de Ca^{2+} ubicado en el RE de las CCs de rata se comporta como una fuente de Ca^{2+} con un mecanismo de CICR fuerte y una captación débil o, por el contrario, lo hace como un sumidero de Ca^{2+} con un mecanismo de CICR débil y una captación fuerte. El segundo es evaluar si la captación y liberación relativa de Ca^{2+} por el reservorio difiere entre CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR. En función de estos objetivos se plantea

evaluar el efecto que sobre las señales de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs tiene: i) la *activación repetitiva* de las CCs de ratas SHR y WKY mediante estímulos despolarizantes recurrentes con solución de alto K^+ ; y, ii) la aplicación de CPA para bloquear de manera *reversible* la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE y evaluar así su participación en estos dos procesos funcionales en CCs de ratas SHR y WKY estimuladas con despolarizaciones recurrentes. A diferencia del estudio hecho por Martínez—Ramírez et al. en CCs de ratón y bovino, en esta investigación (en ratas) se propone el uso de estímulos despolarizantes con solución de alto K^+ como activador (en lugar de ACh) para asegurarnos de que solo los CaVs son activados y evitar así problemas de desensibilización del receptor colinérgico y posible activación de segundos mensajeros. También, en lugar del indicador Fura—2 para medir las variaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, en este trabajo empleamos el indicador fluorescente sensible a $[Ca^{2+}]_i$ Fluo 4—AM, que no tiene reportes de interferencia con el mecanismo de CICR y que además presenta menor afinidad por el Ca^{2+} , por lo que puede medir variaciones más grandes de la $[Ca^{2+}]_i$ sin saturación. Por otra parte, para evaluar la contribución del RE a la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de CAs en CCs de ratas hipertensas (SHR) y normotensas (WKY) no se emplean fármacos con acción irreversible como se abordó en el estudio de Segura—Chama [104]; al contrario, aquí se evalúa el efecto de inhibir de manera *reversible* la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE mediante el uso de CPA, un fármaco que interrumpe la actividad de SERCA y cuyo lavado le permite a la bomba recuperar su función de transporte. Finalmente, en esta investigación se realizan registros de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en forma simultánea con registros de la exocitosis de CAs en la misma célula, por lo que es posible correlacionar el curso temporal de ambos procesos funcionales en respuesta a estímulos despolarizantes o por agonistas, y en respuesta a fármacos para interrogar a las células.

Con base en la deliberación anterior, en este estudio se plantean y se abordan las siguientes preguntas de investigación principales:

1. ¿Cómo afecta la inhibición reversible de la captación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico por CPA la exocitosis de catecolaminas de células cromafines de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y normotensas (WKY)?
2. ¿El efecto del CPA sobre la exocitosis de células cromafines de rata, es parecido al efecto que se ha observado en células cromafines de bovino o es como el que se ha visto en células cromafines en ratón?
3. ¿Existe un efecto diferencial del CPA sobre los transitorios de Ca^{2+} inducidos por despolarización en células cromafines de ratas espontáneamente hipertensas con respecto a su contraparte normotensa?

La medición de la excitación de CAs se hace mediante amperometría de célula única, una técnica electroquímica que mediante el uso de microelectrodos de fibra de carbono — fabricados en el laboratorio— permiten detectar con suficiente sensibilidad y resolución temporal eventos de liberación únicos y en tiempo real en CCs vivas. Por su parte, la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ se mide empleando microscopía de fluorescencia en CCs cargadas con un indicador fluorescente sensible a $[Ca^{2+}]_i$ que al hacer contacto con el catión incrementa su intensidad de emisión con una relación señal—ruido formidable bajo el microscopio.

II. Marco teórico

Capítulo 1

1. Las glándulas adrenales

Referencias sobre la existencia de las glándulas suprarrenales datan de la antigüedad, aunque fue solo hasta después del siglo XVI que se comenzó a recabar conocimiento sobre sus funciones en el organismo, con un incremento acelerado en su estudio en las últimas cinco décadas impulsado por el desarrollo de la biología molecular y de nuevas técnicas de electrofisiología que han permitido desentrañar su estructura y funciones, por demás complejas.

Las primeras indicaciones sobre la existencia de las glándulas adrenales se denotan en la biblia y se sugiere que quizá los hebreos antiguos conocían ya sobre lo que podría causar en el organismo su mal funcionamiento [1]. En el antiguo imperio romano, descripciones mejor documentadas sobre las glándulas adrenales fueron realizadas por el médico Claudius Galen (130-201 a.c), aunque fueron consideradas por él mismo como un tejido renal *accesorio* [2]. La primera descripción formal de las glándulas adrenales, que incluyó varias ilustraciones precisas de estos órganos, fue hecha durante el Renacimiento por el anatomista italiano Bartolomeo Eustachi (1520-1574 d.c) quien en 1563 publicó su trabajo describiendo detalladamente al riñón y refiriéndose a las adrenales como *Glandulae renibus incubentis*, término que implica una función de la glándula como *auxiliar* renal [3]. Fue Jean Riolan (1538-1605 d.c) quien en 1655 nombró las estructuras descritas por Eustachi como *capulae suprarenale* [4]. Entre 1650 y 1750 varios anatomistas describieron la glándula adrenal como un órgano hueco, lleno de líquido. Uno de ellos, Bartolini ‘el viejo’ (1585-1629), propuso que su interior estaba lleno de lo que denominó “bilis negra” [14], quizá una malinterpretación de la autólisis de la médula adrenal luego de la muerte. Ya para la época de La Ilustración, G. Cuvier (1769-1832) fue el primero en reconocer que el centro de la glándula era sólido y morfológicamente distinto de la porción externa [5]. Posteriormente, en 1836, N. Nagel nombró a la porción central sólida de la glándula como *médula* y a su porción externa como *corteza*. Sin embargo, no fue hasta la invención del microscopio compuesto que se pudieron realizar observaciones más precisas de las glándulas adrenales. Utilizando el nuevo

instrumento, A. Ecker (1816-1887) apuntó en 1846 que la médula se destacaba por su brillo; no obstante, fue R. A. Von Kölliker (1817-1905), quien se llevó el crédito de haber hecho la primera descripción anatómica completa de la glándula y postuló que la corteza y la médula tenían sustancias y funciones diferentes [6]. Ya para la segunda mitad del siglo XIX, gracias a estudios más profundos sobre las glándulas adrenales, se pudo establecer sin lugar a duda que la médula adrenal es funcional, histológica y embriológicamente diferente a la corteza [4].

Ya para el siglo XX se profundizó en el estudio de los componentes celulares y moleculares de las distintas partes que componen la glándula y su correspondiente función, parte de lo cual se desglosará en las secciones siguientes.

1.1 Localización, morfología y estructura de la glándula adrenal

En **vertebrados primitivos** no existe la glándula adrenal como un órgano discreto y la médula adrenal está representada por células cromafines que se encuentran dispersas por el organismo del animal [7]. En cuanto al origen de la glándula en vertebrados, un estudio en el que se emplearon 5 especies del **cordado basal** *ascidia* (urocordado), y que buscaba establecer el ancestro filogenético de la médula adrenal en este grupo de animales, se encontró que tienen un sistema bien desarrollado de células con numerosas vesículas llenas de catecolaminas –que se pueden vaciar con reserpina– que en su conjunto forman una *hebra* en el tejido conectivo que recubre el esófago de estos organismos. Este grupo de animales ha sido el más primitivo en el que se ha descrito una médula adrenal formando un “órgano” y se cree que esta estructura sería el precursor filogenético de la médula adrenal [8].

En **anfibios** se encuentran dos patrones de localización y morfología de las glándulas adrenales: en las familias más primitivas de la clase (familias del Orden Urodela: *Sirenidae* y *Proteidae*; familias del Orden Anura: *Ascaphidae*, *Discoglossidae*, *Pipidae*) las glándulas ocupan una posición *medial* sobre la cara *ventral* de los riñones, tienen una morfología *difusa* y están compuesta por *células cromafines* casi en su totalidad; por su parte, en las familias más recientes (familias del Orden Urodela: *Ambystomatidae*, *Pletodontidae*, *Amphiumidae*, *Salamandridae*; familias del Orden Anura: *Microhylidae*, *Ranidae*, *Bufo**nidae*, *Hylidae*), las glándulas se encuentran ocupando una posición *lateral* sobre la superficie renal, tienen morfología *agregada* y *compacta* y están conformadas por una mezcla de *células cromafines* y *células esteroideogénicas*. Se sugiere entonces que en los anfibios se presenta una clara transición posicional, morfológica y estructural de las glándulas adrenales que las llevan a hacerse cada vez más compactas y con presencia de tejido cromafín y esteroideogénico agregado en una sola estructura [9]; adaptaciones probablemente impulsadas por los retos de

supervivencia interpuestos por la selección natural a los animales en su transición del hábitat acuático al hábitat terrestre.

En reptiles como los quelonios (tortugas), los crocodilios (cocodrilos) y las serpientes las glándulas adrenales forman dos estructuras compactas pareadas que se encuentran adheridas a la parte superior de cada riñón, como sucede en los mamíferos, aunque a diferencia de ellos el tejido adrenal no tiene una zonación definida que ubique a las *células cromafines* en posiciones específicas de la glándula con relación a la ubicación que ocupan las restantes *células esteroideogénicas* en la estructura, de hecho, en algunas especies las células cromafines están en la periferia formando una “corteza” que rodea las restantes células que forman la “médula”. También en reptiles y por primera vez en vertebrados, las glándulas adrenales tienen su propio suministro vascular y drenaje venoso sin depender de la circulación renal y del sistema porta para la distribución de sus secreciones [10].

Los mamíferos poseen típicamente dos glándulas adrenales bilaterales retroperitoneales con morfología compacta ubicadas en el polo craneal de cada riñón. A diferencia de los grupos animales descritos hasta ahora, en la mayoría de los mamíferos hay una evidente zonación de la glándula, la cual está conformada por casi cuatro glándulas endocrinas separadas: la porción externa de la estructura se denomina *corteza* y posee tres zonas glandulares con *células esteroideogénicas adrenocorticales* repletas de gotas de lípidos [11]. Esta corteza adrenal rodea una cuarta zona glandular más interna, la *médula*, que está formada principalmente por una masa de células que al contacto con sales de cromo reaccionan para producir un compuesto de color marrón amarillento que las tiñe, por lo que a principios del siglo XIX Alfred Kohn les acuñó el nombre de *células cromafines adrenomedulares* [5]. **En ratas (*Rattus norvegicus*)** (figura 1), las glándulas adrenales están ubicadas hacia la porción craneal del riñón embebidas en el tejido graso retroperitoneal. Son estructuras redondeadas y aunque se han reportado diferencias entre la glándula izquierda y la derecha estas son difíciles de discernir. Las dimensiones de la glándula derecha son 4.0-5.5 mm de largo, 3.0-4.5 mm de ancho y 2.8-3.0 mm de grosor con un peso promedio de 21.8 mg en machos y 25.7 mg en hembras. Las dimensiones de la glándula izquierda son 4.5-5.35 mm de largo, 3.2-4.5 mm de ancho y 2.5-2.8 mm de grosor con un peso promedio de 20.5 mg en machos y 31.6 mg en hembras [12]. La médula ocupa un volumen mucho menor que la corteza y hay un marcado dimorfismo sexual: en ratas macho la médula pesa 1.8 mg y en las hembras 3.1 mg. La médula tiene forma irregular con proyecciones que se adentran hacia la corteza [13], en donde probablemente se lleven a cabo interacciones que modulen las respuestas fisiológicas en las que está involucrada la glándula.

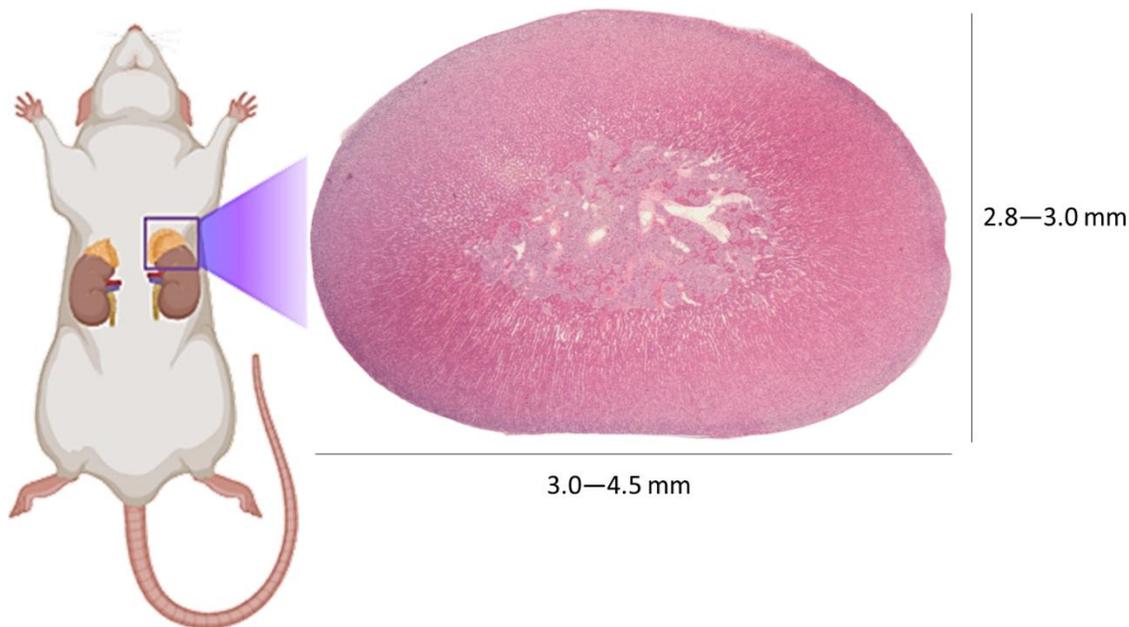


Figura 1. Las glándulas adrenales de la rata. Las glándulas se ubican en el polo craneal de cada riñón en donde se encuentran inmersas en el tejido graso retroperitoneal. La glándula de rata adulta puede llegar a medir 5 mm de largo, 4.5 mm de ancho y hasta 3.0 mm de grosor. En un corte transversal se observa una pequeña porción central blanquecina (la médula) morfológicamente diferente a la porción periférica de mayor volumen y estratificada (la corteza). Modificada de [21].

1.2 Anatomía fisiológica de la glándula adrenal de mamífero

Las glándulas adrenales secretan hormonas con funciones críticas en el metabolismo y la homeostasis iónica del organismo tanto en condiciones basales de reposo como durante el ejercicio, el miedo, episodios de hipoglicemia o hemorragia, infarto agudo de miocardio, los conflictos, entre otras condiciones severas de estrés que demandan respuestas homeostáticas adecuadas. De hecho, las glándulas adrenales son ampliamente reconocidas por regular, junto con el sistema nervioso simpático, la respuesta fisiológica de “lucha o huida”, un conjunto de mecanismos a escala celular, tisular y orgánica que preparan al animal para ejecutar el máximo desempeño físico, cardiovascular y muscular para combatir o evadir situaciones límite que comprometan su supervivencia.

La estructura básica de la glándula adrenal de mamífero está conformada por tres tipos de tejidos distintos [21] que son: la *cápsula*, compuesta por un tejido conectivo delgado que

delimita y encierra la glándula dándole la unidad y compacidad característica que tiene el órgano en este grupo de vertebrados. Por debajo de la cápsula, al interior de la glándula, se presenta una zonación tisular marcada compuesta por 4 regiones glandulares distribuidas entre una porción externa, llamada *corteza*, más grasosa y de origen embrionario mesodérmico; que encierra la porción más interna de la estructura, de color marrón rojizo y de origen embrionario ectodérmico, denominada *médula* [15] [19] (figura 2).

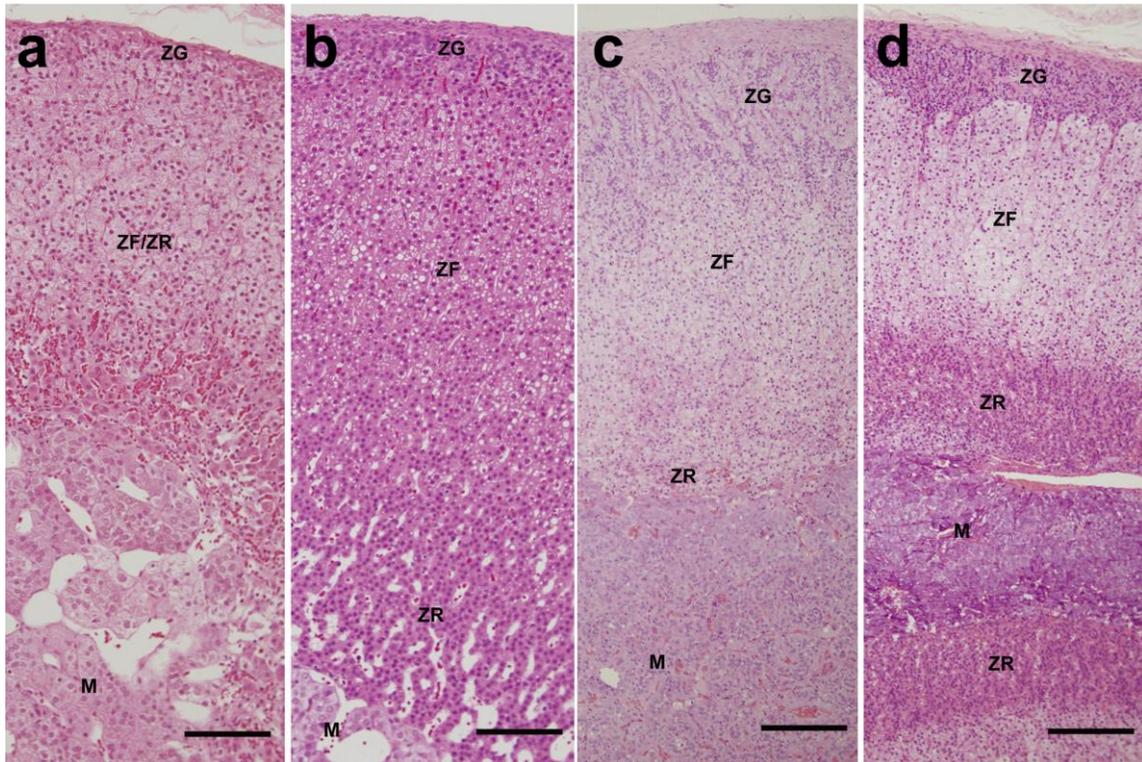


Figura 2. Cortes transversales de las glándulas adrenales de distintas especies de mamífero. A. ratón, B. rata, C. perro y D. macacos. La glándula adrenal posee una cápsula externa de tejido conectivo que encierra dos tejidos endocrinos con orígenes embriológicos diferentes: la corteza y la médula. Histológicamente, la corteza está subdividida en tres capas: la zona glomerulosa (ZG), la zona fasciculada (ZF) y la zona reticular (ZR). La médula (M), por su parte, está compuesta por células cromafines. Barra en a y b: 100 μm ; en c y d: 200 μm . Tomada de [140].

1.2.1 La corteza adrenal

En mamíferos, la corteza adrenal está subdividida en tres zonas glandulares. En cada una de estas zonas se producen hormonas esteroideas a partir de colesterol como único precursor, sin embargo, el esteroide que se sintetiza en cada segmento es distinto y su biosíntesis está determinada por una expresión diferencial zonal de enzimas que catalizan reacciones para generar una u otra molécula en cada zona [17]. La corteza ocupa mayor espacio que la médula adrenal, que abarca un 10-15% de su volumen. Así, la corteza adrenal

está compuesta por tres zonas, desde la más externa a la más interna:

La zona glomerulosa: está compuesta por células más pequeñas y con menos gotas de grasa que aquellas de la *zona fasciculata* y están organizadas de tal manera que tienen apariencia de pequeñas bolas de células, lo que le confiere el nombre a esta zona glandular. En este segmento se realiza la biosíntesis de mineralocorticoides, como la aldosterona, cuya liberación está regulada por la angiotensina II (Ang-II) y que juega un papel fundamental en el balance electrolítico y la regulación de la presión arterial en el organismo [16]. Una alteración patológica asociada al malfuncionamiento de esta zona glandular es el hiperaldosteronismo causado por adenomas productores de aldosterona y que deriva en el síndrome de Conn en humanos [19].

La zona fasciculata: está conformada por células que tienen muchas gotitas de grasa y que se organizan formando largos cordones que corren radialmente en la corteza separados unos a otros por una cama de capilares vasculares. En este segmento se producen glucocorticoides, de los cuales el más representativo es el cortisol. Esta hormona tiene un rol en la regulación del azúcar en la sangre vía gluconeogénesis. El cortisol también modula el sistema inmune y el metabolismo de las grasas, las proteínas y los carbohidratos. Su secreción está bajo el control de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) que es secretada por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria [18]. El exceso en la producción de cortisol conduce a una condición patológica denominada enfermedad de Cushing [19].

La zona reticularis: es la zona más interna de la corteza adrenal en donde se lleva a cabo la biosíntesis de andrógenos adrenales, los cuales están implicados en la aparición y desarrollo de características sexuales secundarias en los animales; aunque la principal fuente de estas hormonas son los testículos [20]. La producción de andrógenos adrenales es regulada por la hormona ACTH y la hormona luteica (LH). Alteraciones en la producción de andrógenos puede llevar a que se padezca de pubertad precoz en los machos y a la aparición de características andróginas en hembras jóvenes [19].

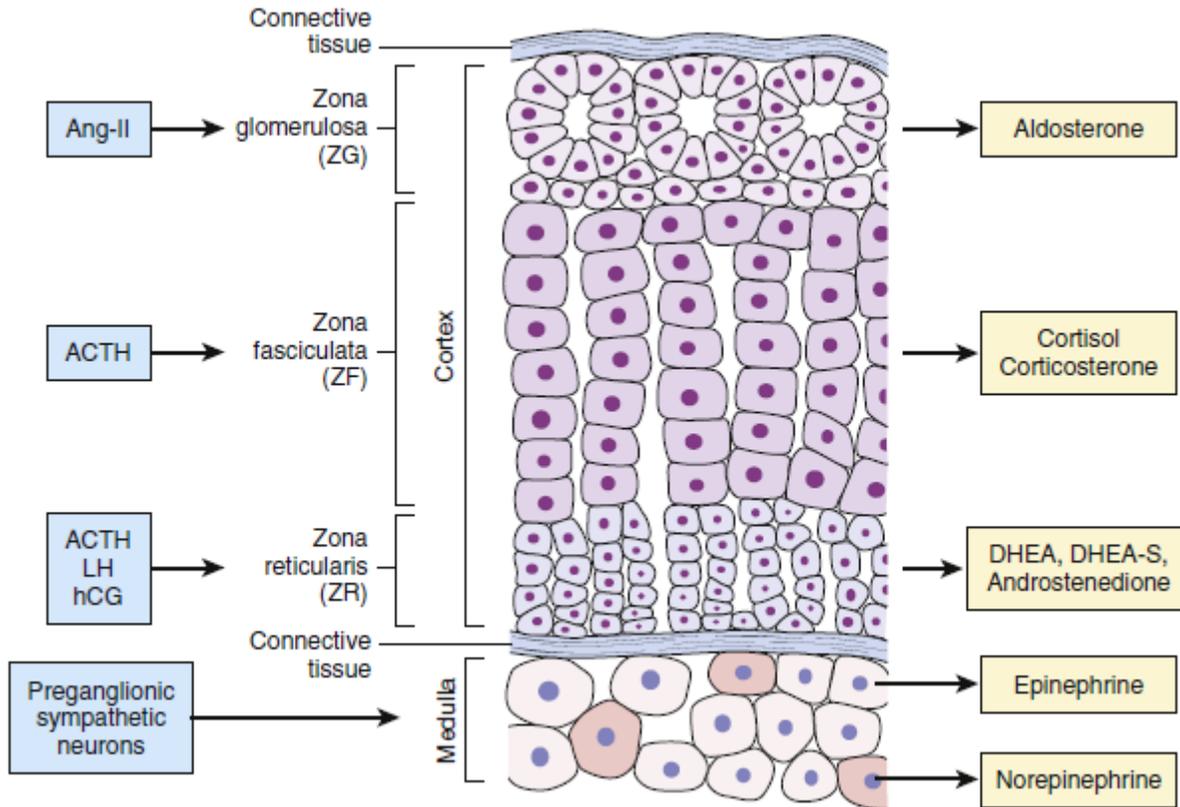


Figura 3. Zonación de la glándula adrenal. En un corte transversal de la glándula se distingue un tejido conectivo en la parte más externa, denominado cápsula; le sigue la corteza, con la zona glomerulosa (ZG) especializada en la síntesis de aldosterona, la zona fasciculada (ZF) que secreta la mayor cantidad de glucocorticoides en el organismo, y la zona reticular (ZR) que libera esteroides adrenales. La porción central de la glándula, la médula, está separada de la corteza por otra capa de tejido conectivo y contiene principalmente células cromafines, especializadas en la síntesis, almacenamiento y secreción de catecolaminas. Modificada de [11].

1.2.2 La médula adrenal

La médula es la zona más interna y central de la glándula adrenal, encerrada por la corteza. Con orígenes embriológicos distintos, la médula adrenal está separada de la corteza por un tejido conectivo en su región de contacto y se encuentran en estrecha interacción. Las células secretoras de catecolaminas que componen la médula adrenal se llaman **células cromafines** [5] y aunque dissociadas en cultivo primario tienen morfología esférica, embebidas en la médula adrenal tienen forma poligonal y se organizan espacialmente formando pequeños grupos a manera de cordones y racimos [21] espaciados por tejido nervioso y vascular que inervan e irrigan la médula, lo que permite su estimulación nerviosa simpática y parasimpática, y la distribución de sus productos de secreción a todo el cuerpo del animal, respectivamente.

Las células cromafines (CCs) son células excitables de la médula adrenal que están especializadas en la síntesis, almacenamiento y secreción vesicular de adrenalina (epinefrina EPI) y noradrenalina (norepinefrina NE), dos de las catecolaminas de suprema importancia fisiológica en mamíferos. Fisiológicamente son excitadas por terminales simpáticas del nervio esplácnico en una sinapsis colinérgica que activa receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR) sobre la membrana de las CCs. Este estímulo gatilla la generación de potenciales de acción (PAs), entrada de calcio a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaVs) y la consecuente exocitosis de sus vesículas que vacían así su contenido en el torrente circulatorio (figura 4) [23] [28] [29]. Además de EPI y NE, en las vesículas de secreción contenidas en las células cromafines también se concentran otras sustancias como ATP, GABA, algunos opioides y cromograninas con acción autocrina y paracrina en la médula adrenal que permiten moldear la respuesta de la glándula en procesos homeostáticos basales (en reposo) así como en situaciones de estrés (respuesta de “lucha o huida”, ejercicio, etc.) del animal.

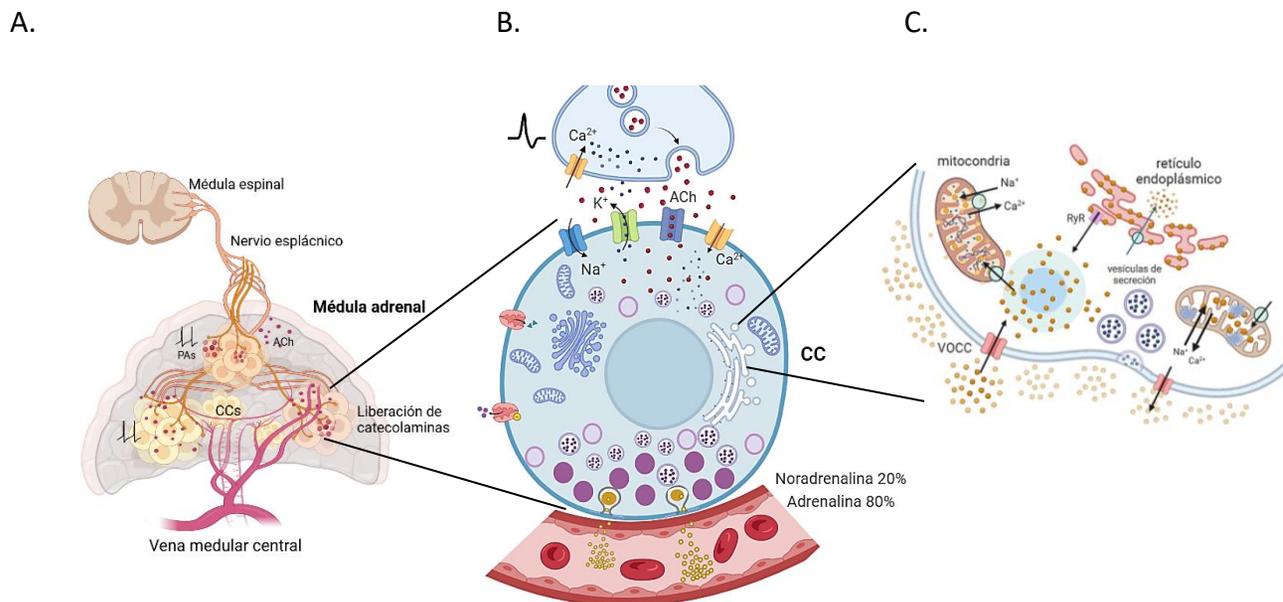


Figura 4. La médula adrenal y las células cromafines. A. Las células cromafines (CCs) de la médula adrenal son estimuladas por terminales sinápticas del nervio esplácnico, un ramillete de neuronas simpáticas pre—ganglionares cuyos somas yacen en la médula espinal. B. El estímulo simpático—adrenal está dado por una sinapsis colinérgica cuyo neurotransmisor, acetilcolina, se une a receptores de ACh nicotínicos y muscarínicos que conducen a la despolarización de la MP, la producción de PAs y finalmente la entrada de Ca^{2+} a la célula, lo que gatilla la secreción de CAs. La EPI y la NE son descargadas en la sangre para ir a sus blancos en otros lugares del organismo. C. El proceso de exocitosis de CAs tras la llegada de un estímulo en las CCs resulta de una compleja regulación de la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]$ en la que participan los canales de Ca^{2+} operados por voltaje y organelos intracelulares como las mitocondrias y el RE. Ilustración elaborada en Biorender por Angélica Martínez B.

En cuanto a la regulación de procesos homeostáticos basales, una característica sorprendente del sistema nervioso simpático (SNS) es que utiliza bajas frecuencias de estimulación para

activar sus efectores autonómicos. A esta estimulación de baja frecuencia se le denomina 'tono simpático'. En el clásico libro de Fisiología Médica de Guyton & Hall [25] se menciona que: "un solo impulso nervioso, generado cada pocos segundos (< 1 Hz) es suficiente para mantener un efecto simpático o parasimpático normal. Por su parte, la activación total ocurre cuando las terminales nerviosas descargan unas 10-20 veces por segundo (10-20 Hz)". Esto contrasta por mucho con la activación completa de neuronas motoras del músculo esquelético (rama somática del SNP) que llegan a tener descargas de potenciales de acción de 50 hasta más de 500 veces por segundo (50-500 Hz). En humanos, la tasa de secreción de la médula adrenal en el reposo es de aproximadamente $200 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de adrenalina (EPI) y de $50 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ de noradrenalina (NE) que, junto con la producción de NE de las terminales simpáticas, produce concentraciones plasmáticas de catecolaminas (EPI: 97 pg mL^{-1} , 0.55 nM ; NE: 253 pg mL^{-1} , 1.25 nM) que son suficientes para mantener la presión arterial dentro de valores aceptables de reposo aun si toda la inervación simpática directa del sistema cardiovascular se inhibiera [23]. En este sentido, la estimulación simpática de los órganos periféricos se da por dos vías: *directamente* por las terminales nerviosas de los nervios simpáticos e *indirectamente* por las hormonas secretadas por la médula adrenal. Este mecanismo de estimulación dual constituye un 'factor de seguridad' que permite que uno sustituya al otro por si uno hace falta. Otro aspecto no menor que destaca la importancia fisiológica de la médula adrenal es que la adrenalina y noradrenalina que secreta, al ser liberada a la circulación, estimula tejidos y células que no están directamente inervadas por las fibras simpáticas. Esto es particularmente importante si se tiene en cuenta que la adrenalina secretada por la médula adrenal, a diferencia de la noradrenalina liberada por las terminales simpáticas, incrementa la tasa metabólica de prácticamente cada célula en el organismo.

Por su parte, en situaciones de estrés como el miedo, el combate, la actividad física intensa, la hipoglicemia o la hipoxia, el sistema nervioso simpático produce una gran descarga sináptica excitadora sobre las células cromafines de la médula adrenal que conduce a la liberación de una oleada de adrenalina y noradrenalina que genera concentraciones plasmáticas más de 60 veces por encima de los valores basales [32]. Esto permite que el cuerpo desarrolle casi instantáneamente la respuesta de "**lucha o huida**", un conjunto de mecanismos que preparan al organismo para el combate o para evadir el peligro que le acecha. Durante esta oleada de catecolaminas liberadas en el torrente circulatorio: aumenta la frecuencia cardíaca, la fuerza de contracción del corazón y la presión arterial; la sangre se redistribuye hacia el músculo cardíaco y el músculo esquelético de manera que es posible desarrollar un mayor desempeño físico y potencia muscular; el metabolismo celular incrementa en todas las células del organismo; la glucosa es movilizada desde el hígado y los músculos para aumentar su concentración en sangre; los ácidos grasos también son movilizados por lipólisis desde el

tejido adiposo al torrente circulatorio; las pupilas se dilatan para alcanzar una mayor agudeza visual; y los bronquiolos se expanden para introducir el máximo volumen de aire en los pulmones [26]. Esta respuesta altamente coordinada y precisa se lleva a cabo para mantener la homeostasis del medio interno en situaciones de estrés [27].

La capacidad de la glándula adrenal, y en especial de la médula, para regular algunas funciones basales del organismo y la respuesta al estrés depende críticamente tanto de su estimulación por parte de las terminales nerviosas del nervio esplácnico que la inervan como de su irrigación vascular, que permite que sus secreciones lleguen a la circulación y se distribuyan alcanzando a cada célula del organismo.

1.2.3 Inervación de la glándula adrenal

El sistema nervioso (SN) de los mamíferos está compuesto por el SN central (SNC) y por el SN periférico (SNP). El SNP se divide en SN somático que inerva al músculo esquelético y controla así las actividades motrices voluntarias del cuerpo y, por otro lado, el SN autónomo (SNA), que inerva el músculo liso, el músculo cardíaco, las vísceras y las glándulas, y que gobierna de esta manera las acciones involuntarias del organismo. A su vez, el SNA consiste en dos ramas: el SN simpático (SNS) y el SN parasimpático. El SNS cuenta con una gran variedad de células que podrían agruparse en dos componentes: **1. Las neuronas simpáticas**, las cuales forman los ganglios paravertebrales y prevertebrales y cuyas terminales nerviosas noradrenérgicas inervan y regulan la función simpática de la mayoría de los órganos y vasos sanguíneos por medio de la liberación de noradrenalina (NE). **2. Las células cromafines adrenales**, que tras ser estimuladas por acetilcolina (ACh) o por el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP), liberados desde el nervio esplácnico, secretan adrenalina (EPI) y noradrenalina (NE) que van directo a la sangre [28]. Por su origen embriológico común, las células cromafines son células excitables con características electrofisiológicas muy parecidas a las de las neuronas [29], dado que cuentan con conexiones nerviosas aferentes y eferentes que la inervan desde proyecciones nerviosas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales [30].

La inervación simpática de todos los órganos de los mamíferos tiene una arquitectura anatómica especializada que inicia con la acción de neuronas simpáticas preganglionares (NSPre), cuyos somas se encuentran entre los segmentos C8 y L3 de la médula espinal. En un corte transversal de la médula espinal entre estos segmentos se han identificado 4 sitios en donde se localizan los somas de las NSPre: el funículo lateral, la columna de células intermediolateral, el núcleo intercalado y el núcleo autonómico central (figura 5). Desde estos

sitios, las NSPre proyectan sus axones hacia la raíz ventral y desde allí hacia sus sitios diana para: i) hacer sinapsis con neuronas simpáticas postganglionares (NSPost) en ganglios paravertebrales o prevertebrales, o, ii) hacer sinapsis con células cromafines en la médula adrenal [32]. Por medio de experimentos de tinción retrógrada de la médula adrenal de rata se ha podido rastrear que las NSPre que la inervan nacen entre los segmentos espinales T1 a L1 y sus somas se encuentran localizados principalmente en la columna de células intermediolateral [31]. Desde la columna intermediolateral de T1 a L1 las NSPre que van a inervar la médula proyectan sus axones hacia la raíz ventral y desde allí a algunos ganglios paravertebrales y prevertebrales sin hacer sinapsis con las NSPost allí presentes. Los axones de las NSPre salen de los ganglios y, empaquetados ya en el nervio esplácnico, viajan a inervar a la glándula adrenal. Allí los axones de las NSPre penetran la cápsula adrenal y se bifurcan para formar una extensa red subcapsular que envuelve la estructura, pasan luego a través de la corteza sin bifurcarse, entran a la médula y entonces se dividen en pequeños ramilletes de fibras nerviosas y axones individuales que finalmente forman sinapsis colinérgicas clásicas con las células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas medulares [36]. La mayoría de las fibras nerviosas que inervan la médula son amielínicas y se encuentran formando asociaciones con células de Schwann al nivel subcortical y entre los racimos de CCs adrenérgicas y noradrenérgicas, aunque eventualmente pueden hallarse fibras mielinizadas también [30]. Los racimos de CCs son luego penetrados por fibras nerviosas muy finas asociadas con células sustentaculares para formar una pequeña red de terminales varicosas en su interior. Las terminales sinápticas que contactan a las CCs contienen vesículas grandes y pequeñas con centro electrodenso y electroclaro, respectivamente, que contienen el neurotransmisor acetilcolina (ACh). La ACh es liberada por exocitosis desde la terminal sináptica y se une a receptores colinérgicos sobre la superficie de las CCs, lo que dispara la exocitosis regulada de catecolaminas que depende críticamente de la dinámica intracelular de calcio. El estímulo colinérgico también induce la síntesis de más catecolaminas al activar a la enzima hidroxilasa de tirosina (TH) de las CCs. Con algunas variaciones específicas de la especie, los receptores colinérgicos en la membrana de las CCs son de tipo nicotínico y muscarínico [37]. Se ha observado que las CCs adrenérgicas y noradrenérgicas tienen inervación simpática independiente y que cada tipo celular se encuentra formando pequeñas agrupaciones de células que son estimuladas en conjunto [30] [38] (figuras 4 y 5).

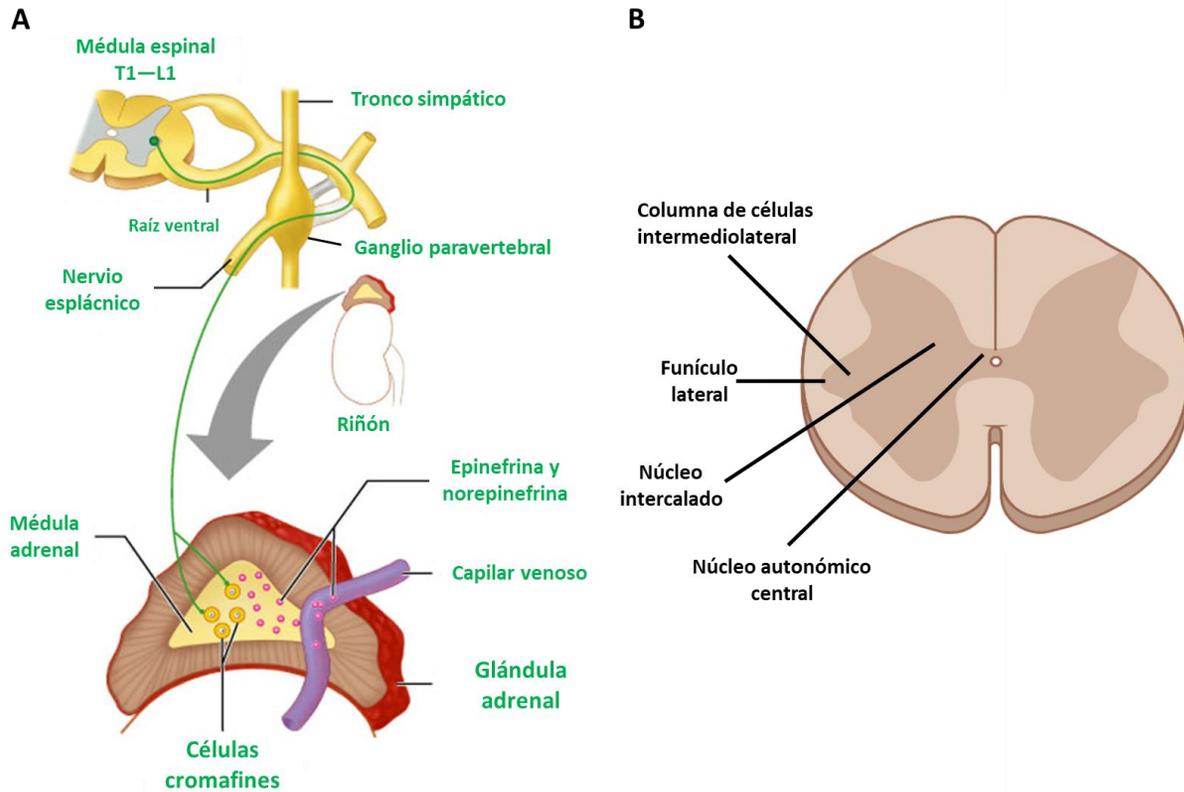


Figura 5. Inervación de la médula adrenal. **A.** Neuronas simpáticas preganglionares (NSPre) que nacen en la columna de células intermediolateral de la médula espinal forman el nervio esplácnico que contacta las CCs de la médula adrenal. En su viaje, las NSPre pasan por la raíz ventral y algunos ganglios para y prevertebrales sin hacer sinapsis. **B.** Las NSPre que forman el nervio esplácnico que inerva la médula adrenal nacen en la columna de células intermediolateral de la médula espinal entre las vértebras T1 y L1.

La inervación directa de la médula adrenal por parte de las NSPre es una de las razones por las que las células cromafines se consideran como un tipo de NSPost que ha perdido sus axones y se ha especializado en la producción y exocitosis masiva de catecolaminas y otros productos de secreción que se vierten directamente al torrente circulatorio. Así, al perder sus axones, las cromafines “NSPost” dejaron de inervar *directamente* sus dianas para hacerlo *indirectamente* en la modalidad de irrigación vascular a cada célula del organismo, apoyando y sosteniendo así la función del sistema nervioso simpático (SNS) por medio de lo que se ha denominado *eje simpático—adrenal* [28] [33] [34], un circuito funcional conformado por el conjunto de tejidos y órganos que regulan la función de las CCs adrenales por medio de señales que se originan en el cerebro, viajan a la médula espinal y de allí a la médula adrenal. Las NSPre en la médula adrenal son reguladas por mecanismos de retroalimentación de ‘loop largo’ con el SNC y de ‘loop corto’ con las células ganglionares adrenomedulares allí presentes *in situ*.

En cuanto a la inervación parasimpática de la médula, en el clásico trabajo de Coupland [39] sobre la inervación normal de la glándula adrenal destaca que el nervio vago podría influenciar la función de las CCs. Finalmente, se ha reportado que la médula adrenal tiene una inervación altamente compleja por terminales sensoriales cuyos somas se encuentran en los ganglios de la raíz dorsal y que tiene efectos sobre las CCs y la vasculatura adrenomedular [40] [41].

1.2.4 Irrigación de la glándula adrenal

Con un flujo sanguíneo de 300 mL/min/100 g de tejido en humanos, las glándulas adrenales son los órganos más irrigados y vascularizados después de los riñones [43]. El suministro sanguíneo hacia cada glándula adrenal está dado por al menos medio centenar de ramificaciones vasculares que nacen directamente de la aorta abdominal, la arteria renal y la arteria frénica, y que forman en conjunto las arterias adrenales [16]. Son tres las arterias adrenales en la rata: la arteria adrenal **cranial** y la arteria adrenal **media** que nacen en la arteria frénica, y la arteria adrenal **caudal** que puede nacer en la aorta abdominal o en la arteria renal o en la arteria frénica [46]. Las arterias adrenales contactan la glándula, atraviesan la cápsula y, justo por debajo de ella, forman un plexo que se extiende a lo largo de toda la circunferencia subcapsular desde donde entran e irrigan la corteza y la médula de manera independiente. Entre 4 y 6 ramificaciones vasculares (en la rata) nacen en el plexo subcapsular formando así las arterias medulares que luego atraviesan la corteza sin bifurcarse hasta llegar a la médula, donde se dividen para formar un segundo plexo: el plexo medular. Junto con mastocitos, linfocitos, macrófagos y fibroblastos el plexo medular forma a su paso por la médula un tejido conectivo altamente vascularizado que se desplaza entre los racimos de las CCs [42]. El plexo medular adrenal drena luego su contenido en la vena medular central a nivel de la frontera médulo-cortical y de allí pasa a la vena cava inferior y a la vena renal [29].

Las arterias medulares que forman el plexo medular poseen una capa endotelial, una capa de músculo liso y una membrana basal. Por su parte, cada agrupación de CCs se encuentra embebida en una canasta de colágeno que forma una lámina altamente enmallada alrededor de la vena medular central [42]. Así, para que la secreción de las CCs alcance el torrente circulatorio deben atravesar: el espacio submembranal, la lámina basal de las CCs, el tejido conectivo (colágeno, etc.), la membrana basal externa del capilar y el espacio subendotelial [29].

Capítulo 2

2. Las células cromafines adrenales

Las células cromafines (CCs) de la glándula adrenal son neuronas simpáticas postganglionares modificadas, derivadas de la cresta neural, que forman dos poblaciones de células con la capacidad de sintetizar, almacenar y secretar dos tipos principales de catecolaminas: adrenalina (A) y noradrenalina (NA) [29]. Dado su origen embriológico común, las CCs mantienen la plasticidad para desarrollar características de neuronas cuando son cultivadas con factores de crecimiento neurales y además manifiestan señales de $[Ca^{2+}]_i$ parecidas a las de neuronas simpáticas [47], por lo que se usan comúnmente como modelos celulares de neuronas. Dado que los productos de secreción de las CCs actúan a distancia en el organismo, también se utilizan como modelo de células endocrinas [34]. Las CCs intra-adrenales se localizan en el centro de la glándula, la médula, una estructura relativamente compacta y altamente vascularizada que en ratas ocupa 1/10 del volumen total de la glándula [45]. En la médula, las CCs se organizan formando grupos (*clústers*) a manera de racimos y presentan una morfología poligonal o columnar, aunque disociadas en cultivo suelen ser esféricas.

Las CCs presentan un núcleo (ocasionalmente dos) de forma elipsoide o redondo, grande o chico que suele localizarse en el centro de la célula, aunque con poca frecuencia es excéntrico; y posee uno, dos y hasta tres nucleolos prominentes. La cromatina se localiza en la periferia nuclear a manera de cúmulos cuya apariencia puede ser fina o gruesa. El citoplasma de las CCs contiene gránulos de secreción cromafines (GCCs) (característica que las define) y organelos celulares comunes como aparato de Golgi, retículo endoplásmico (RE) rugoso, ribosomas libres, mitocondrias, lisosomas, vacuolas, cuerpos multivesiculares, microfilamentos, microtúbulos, centriolos y muy ocasionalmente cilios. El aparato de Golgi usualmente se ubica al lado del núcleo en forma de arco y los demás organelos se distribuyen entre los gránulos cromafines, ocasionalmente se observan gránulos de glucógeno. Cuando están disociadas en cultivo, se distinguen 4 subtipos de CCs de acuerdo con sus características ultraestructurales: **i.** células con citoplasma denso, y gránulos densos y pequeños; **ii.** células con citoplasma denso y gránulos grandes; **iii.** células con citoplasma claro, gránulos con un halo de luz concéntrico y un aparato de Golgi bien desarrollado, y; **iv.** células con citoplasma moderadamente denso y un RE con varicosidades evidentes. Las CCs del tipo **i** y **iii** son adrenérgicas mientras que las del tipo **ii** y **iv** son noradrenérgicas [48] y su porcentaje en la médula adrenal es característico de cada especie. Por ejemplo, se ha reportado que la médula adrenal de la rata secreta un 90%

EPI y 10% NE; en humanos la proporción es 80% EPI y 20% NE; en bovinos, ratones y perros la glándula secreta 75% de EPI y 25% NE; y, en gatos y cabras la proporción es 60% EPI y 40% NE [28].

2.1 Síntesis, almacenamiento y exocitosis de catecolaminas

Como se mencionó previamente, las CCs son células especializadas en la síntesis, almacenamiento y exocitosis de EPI y NE, entre otros productos de secreción.

2.1.1 Síntesis y almacenamiento de EPI y NE en CCs adrenales

Las CCs constituyen el paradigma de la síntesis completa de CAs desde el aminoácido L-tirosina hasta la CA principal producida en la médula adrenal: la adrenalina (EPI). Las CAs pertenecen a un grupo de transmisores llamados monoaminas, que estructuralmente tienen un grupo *catecol*, esto es, una molécula de benceno con dos grupos hidroxilo (–OH), enlazado a una molécula de *etanolamina* como cadena lateral con un solo grupo amino que puede o no estar sustituido [49]. El primer paso es la conversión de L-tirosina en L-DOPA por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), que se encuentra en el citosol de las CCs (figura 6). La TH es la enzima más importante en la síntesis de CAs pues representa el paso limitante de la vía. Una segunda enzima, la DOPA descarboxilasa (AAAD), también presente en el citosol, convierte rápidamente L-DOPA en dopamina (DA). La enzima que convierte DA en NE en el tercer paso de la vía, la dopamina beta hidroxilasa (DβH), se encuentra únicamente dentro de los gránulos cromafines (GCC), por lo que la DA debe ser transportada a su interior para que la síntesis prosiga. Al interior de los GCCs se encuentra el ácido ascórbico (Vit-C), que es usado como donante de electrones por la DβH en la síntesis de NE. El poder reductor de la Vit-C al interior del GCC es restablecido por el bombeo de protones desde el citosol a través de la proteína citocromo b_{561} ubicada en la membrana del GCC, lo que garantiza que la síntesis de NE continúe [50] [51]. Hasta este punto llega la síntesis de CAs en las CCs noradrenérgicas y, al interior de vesículas sinápticas, en neuronas noradrenérgicas. Sin embargo, en la mayoría de CCs se produce un paso adicional en la vía: la conversión de NE en EPI por la enzima fenil-etanolamina-N-metil transferasa (PNMT). Dado que la enzima PNMT solo se encuentra en el citosol, la NE sale por difusión desde el gránulo y es convertida en EPI en el citoplasma. Finalmente, la EPI es ingresada de vuelta al gránulo para su almacenamiento y eventual secreción [5] [170].

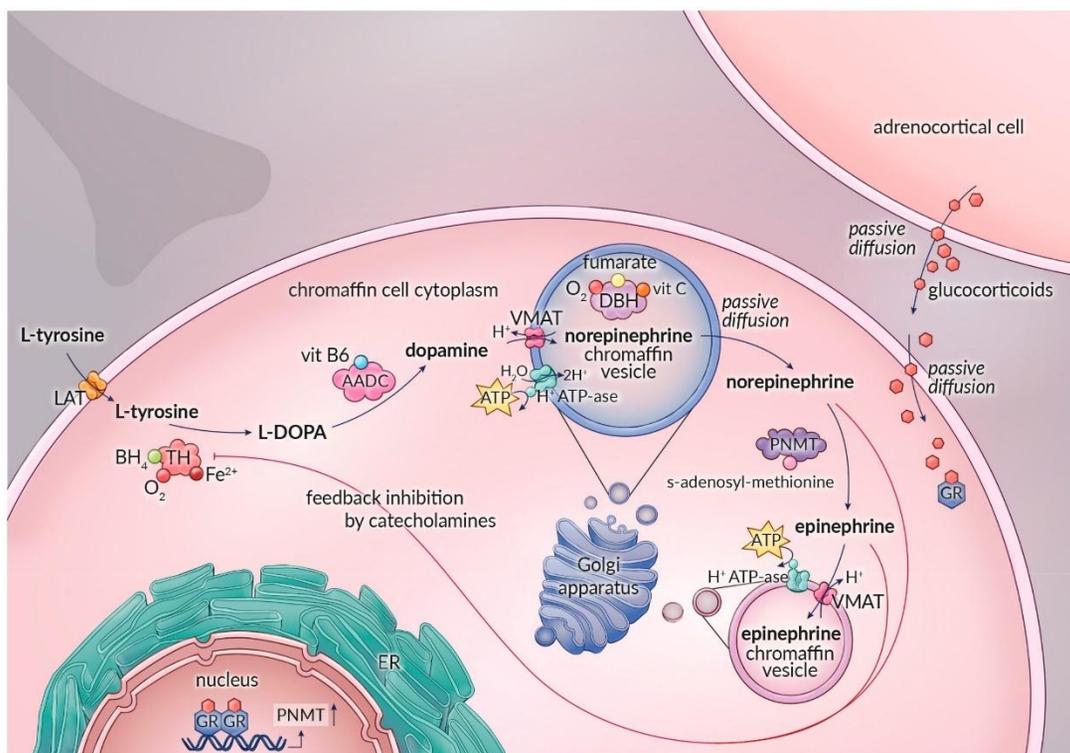


Figura 6. Proceso de síntesis enzimática de catecolaminas en las células cromafines adrenales. El precursor de la vía metabólica de síntesis de CAs es el aminoácido L—tirosina. Este es convertido en L—DOPA por la enzima hidroxilasa de tirosina (TH) en el citosol. La L—DOPA es decarboxilada por la enzima AAAD para producir dopamina (DA), la cual es transportada hacia la matriz vesicular por el transportador de monoaminas vesicular (VMAT). La síntesis de NE ocurre al interior del GCC por la enzima beta—hidroxilasa de dopamina (DBH) utilizando DA como sustrato. En CCs adrenérgicas, la NE debe salir del GCC para ser transformada en EPI en el citosol por la enzima fenil—etanolamina N—metil transferasa (PNMT). La EPI es introducida al GCC para su acumulación por el transportador VMAT. Tomado de [170].

Después de su síntesis, las CAs son almacenadas en los GCCs para garantizar su disponibilidad ante un eventual proceso de exocitosis. Los GCCs son los organelos característicos de las CCs (figura 7). A diferencia de las vesículas sinápticas (VS) que se encuentran en las neuronas, los GCCs tienen una matriz que al microscopio electrónico se observa densa u oscura. Además, los GCCs alcanzan tamaños de hasta ≈ 300 nm de diámetro mientras que las VS solo llegan a ≈ 50 nm [54]. Otra diferencia que distingue a estos organelos es que, además de CAs y ATP, los GCCs almacenan proteínas como algunas graninas, péptidos y GABA. La importancia de los GCCs radica en su extraordinaria capacidad para concentrar estos solutos en su interior. Por ejemplo, la concentración de CA libre en el citosol es de 5 a 50 μ M mientras que en el interior de los GCCs es de 0.8 a 1.0 M dependiendo de la especie, lo que resulta en un gradiente de concentración de 16-20 mil veces entre ambos compartimentos [52]. Este gradiente supone que las CAs deban ser bombeadas contra gradiente hacia el interior de los GCCs con el consiguiente gasto de ATP, que es suministrado por una ATPasa de H^+ (V-ATPasa) localizada en la membrana vesicular [49] (figura 7). La ATPasa de H^+ es una

bomba electrogénica que acumula protones en los GCCs hasta que se alcanza un potencial de +80mV, lo que gatilla la entrada de cloruro (Cl^-) en su interior. La entrada de Cl^- en el GCC tiene dos consecuencias: la primera es que se une a los H^+ estabilizando así el gradiente de potencial (Ψ) que genera la bomba y, en segundo lugar, permite que disminuya el pH en el interior de los GCCs hasta alcanzar un valor de ≈ 5.5 . Los H^+ bombeados por la V-ATPasa son entonces usados como contraiones para permitir la concentración de CAs, ATP y Ca^{2+} [28]. Así, cualquier alteración en el pH vesicular puede conducir a una pérdida en la capacidad de los GCCs para almacenar solutos. El reto termodinámico, energéticamente demandante, que implica la concentración de CAs al interior de los GCCs lo realiza el transportador de monoaminas vesicular (VMAT) (figuras 6 y 7). El VMAT es un intercambiador que acopla el transporte de 2H^+ hacia el citosol, proceso exergónico, al transporte de DA, NE o EPI hacia el lumen del GCC, proceso endergónico. El VMAT pertenece a la superfamilia de intercambiadores extrusores de toxinas (TEXANS) que también se encuentran en bacterias. Desde un punto de vista evolutivo, se piensa **que** el secuestro de CAs por VMAT al interior de los GCCs protege a las neuronas dopaminérgicas y CCs del estrés oxidativo que causa su degradación en el citoplasma por parte de la oxidasa de monoaminas (MAO), de una manera similar a la función que desempeña su homólogo evolutivo VMAT en bacterias al extruir toxinas fuera del citoplasma bacteriano [53]. Se han identificado y clonado dos isoformas de VMAT. El VMAT1, que se expresa en los GCCs de las CCs adrenales y de las células enterocromafines intestinales, y el VMAT2, que se localiza en las VSs de neuronas del SNC, de las neuronas simpáticas posganglionares y también en los GCCs. Como se mencionó antes, en los GCCs también se concentran cromograninas (Cg): estas proteínas son sintetizadas en el aparato de Golgi y su ensamblaje continúa a lo largo de las porciones *cis*, *med* y *trans* de este. El GCC se forma por un proceso de gemación de la membrana de la red trans-Golgi (RTG) que encapsula y estabiliza las proteínas que formarán su matriz. La RTG es también la encargada de direccionar las gemas disociadas hacia la vía secretora regulada (exocitosis), lo que las convierte en GCCs nacientes que están en la capacidad de concentrar CAs y los demás solutos que los componen al finalizar su proceso de maduración.

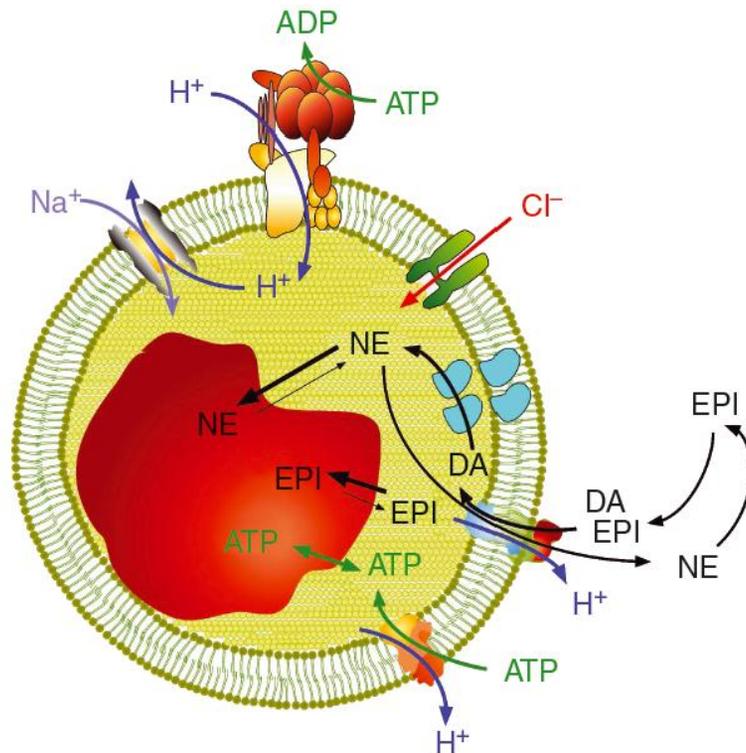


Figura 7. El gránulo cromafín (GCC). El GCC es una estructura altamente especializada en el almacenamiento de grandes cantidades de diferentes solutos. El mecanismo de almacenamiento cursa con gasto de ATP por parte de la bomba ATPasa vesicular (V-ATPasa) que transporta protones (H^+) en contra del gradiente electroquímico hacia el interior del GCC. Para reducir el gradiente de voltaje se abren canales de Cl^- que, a su vez, permite que el pH caiga. Los H^+ acumulados son luego utilizados por el transportador vesicular de monoaminas (VMAT) o por el transportador de nucleótidos (VNUT) para acumular CAs (DA, NE y EPI) y ATP hacia su interior, respectivamente. La mayoría de los solutos que ingresan al GCC se unen a la matriz vesicular, lo que garantiza que se mantenga buena parte de la isotonicidad respecto al citosol permitiendo así la acumulación de más y más solutos. Tomado de [28].

Finalmente, una complicación termodinámica que se deduce de las características únicas de los GCCs es que, al almacenar enormes cantidades de solutos (0.5-1 M de CAs, 0.2 M de ATP, 40 mM de Ca^{2+} y cantidades variables de GABA, péptidos y proteínas), podría pensarse que la presión osmótica hacia su interior hiciera estallar el gránulo. No obstante, tanto las VSs como los GCCs persisten gracias a la interacción entre los propios componentes vesiculares, en las que las Cgs y el ATP juegan un papel fundamental [54]. En ratones mutantes para $CgA^{-/-}$, $CgB^{-/-}$ o dobles mutantes $CgA^{-/-}/CgB^{-/-}$ se observa una aceleración en el proceso de exocitosis como consecuencia de la dificultad del gránulo para almacenar solutos, lo que sugiere dos funciones para las Cgs: la primera es que funcionan como una matriz proteica en la que se adsorben las CAs formando agregados que evitan que estas se encuentren libres y osmóticamente activas dentro del gránulo; la segunda es que enlentecen la liberación por exocitosis pues el proceso de de-adsorción de CAs de la matriz proteica tiene una cierta demora [58]. En la matriz de proteínas también se encuentra ATP como agente agregante de

CAs. El ATP es transportado al interior del GCC por el transportador de nucleótidos vesicular (VNUT) que utiliza H^+ como contraíón y que, con su grupo fosfato, estabilizan los grupos amino de las aminas acumuladas [56]. Como resultado de esta interacción de componentes intravesiculares se distinguen dos fases al interior del gránulo: una fase agregada compuesta por una matriz proteica (Cg A, Cg B y ATP) donde se adsorben las CAs y que representa el núcleo denso con el 90% del volumen intravesicular; y otra fase libre con aminas que explica el halo claro, con el 10% del volumen restante. Tanto la fase agregada como la fase libre se encuentran en equilibrio (figura 7).

2.1.2 Exocitosis de EPI y NE en CCs adrenales

La liberación del contenido de los GCCs ocurre por exocitosis regulada, un proceso estrictamente dependiente del incremento de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y que implica: i. la movilización de GCCs desde zonas lejanas adentro de la célula hacia la membrana plasmática (MP), proceso en el que los gránulos pasan por sucesivas etapas de 'maduración' en el que se *acoplan* a la maquinaria secretora y se terminan de *abastecer* con su contenido (carga) en dos pasos denominados *docking* y *priming*, respectivamente; y, ii. la fusión de la membrana del GCC 'maduro' con la membrana plasmática que da lugar a la formación de un poro de fusión que eventualmente se expande, colapsa y libera el contenido intravesicular al espacio extracelular, lo que va seguido de la recaptura de la membrana del GCC por el proceso de endocitosis. Varias características de la maquinaria molecular y del proceso mismo de exocitosis que se observan en CCs son similares a los observadas en la secreción de neurotransmisores en neuronas, una razón adicional para el estudio de las CCs como modelos neuronales de secreción [28].

Las CCs son máquinas celulares que han optimizado su proceso de secreción a lo largo de su historia evolutiva, por lo que tienen todos los componentes moleculares y regulatorios que les permiten sintetizar, almacenar y liberar solutos de manera eficiente al torrente circulatorio. Cada CC contiene aproximadamente 12×10^3 GCCs. Si se liberaran todos los gránulos desde todas las células en ambas médulas al mismo tiempo, resultaría en una dosis letal para el organismo. Para evitar un posible envenenamiento, las CCs tienen varios mecanismos para regular el proceso de liberación. Uno de ellos es que solo una pequeña fracción de GCCs está disponible para su liberación inmediata, el llamado '*pool*' listo para liberarse (PLL), mientras que el resto de los gránulos (70-80%), el denominado '*pool*' de reserva (PR), tienen que pasar por los procesos de *docking* y *priming* (acople y cebado) antes de fusionarse a la membrana plasmática y secretar su contenido [28]. La secreción del PLL y su reabastecimiento por parte del PR explican los dos componentes cinéticos que se observan en

un evento de exocitosis: una fase inicial rápida en la que se secretan GCCs maduros del PLL que ya estaban en fase de *docking* y *priming* previo al estímulo, seguida de una fase final enlentecida por varios componentes cinéticos que reflejan diferentes pasos discretos en el proceso de movilización, maduración y liberación de gránulos y que fisiológicamente está dado por la secreción del PLL que está siendo reabastecido por el PR [60]. Que haya diferentes componentes cinéticos durante la exocitosis revela que el proceso de secreción no es lineal, sino que se compone de pasos, algunos limitantes, que dependen de reacciones específicas de proteínas de la maquinaria molecular de secreción para que la liberación pueda proseguir tras la llegada de estímulos adicionales o durante una estimulación sostenida. Así, agrupando los gránulos en diferentes *pools* las CCs regulan la liberación de su contenido vesicular tras la llegada de un estímulo garantizando que haya gránulos disponibles para la liberación ante estímulos posteriores sin envenenar al organismo.

Aunque no todos los pasos de la exocitosis se han dilucidado, se tiene un consenso general de los protagonistas moleculares y los pasos principales que intervienen en el proceso (figura 8). En síntesis, el proceso completo es como sigue: los GCCs comienzan a formarse en la RTG por escisión de una porción de su membrana que encierra a las proteínas que harán parte de su contenido interno como la Cg A y la Cg B, etc. (1). Desde allí, los GCCs son transportados por medio de la red de microtúbulos a los sitios de liberación en la membrana plasmática mientras se van llenando con su contenido intragranular (2). A su llegada a los sitios de liberación, la actina dirige los GCCs a los sitios específicos de la membrana plasmática en donde tiene lugar su anclaje (3) y acoplamiento al subplasmalema (*docking*) (4), a la vez que el complejo SNARE comienza a organizarse. En el siguiente paso la complexina se une al complejo SNARE y junto con Munc-18 hacen que la unión de proteínas del complejo se haga más fuerte haciéndolo más compacto, lo que resulta en un acercamiento de la membrana del GCC a la membrana plasmática que ahora quedan separadas apenas por una lámina de agua (*priming*) (5). Superar la barrera acuosa para que se dé la fusión de las membranas es el paso que requiere mayor energía en el proceso de secreción. Para esto Munc-13 se une a la syntaxina cambiando su conformación haciendo que las proteínas SNARE se cierren, aparten las membranas entre sí y abran el poro de fusión de manera similar a la apertura de una cremallera. El poro de fusión inicial permite un intercambio limitado de solutos y agua (6) que es seguido por un proceso de dilatación del poro que podría dar lugar a una liberación parcial o total del contenido en dependencia del grado de dilatación y la duración del estado sigma (Ω) (7). Al terminar la secreción, el complejo SNARE es desensamblado. Cuando ocurre exocitosis parcial la secreción es reversible y el gránulo es recuperado por un proceso denominado cavicaptura, sin embargo, se desconoce si ese GCC pasa otra vez por los procesos de *docking* y *priming* o si, por el contrario, es excitado de nuevo (8). Finalmente, la membrana del GCC que ya ha descargado su contenido es recuperada por endocitosis, proceso en el que

se han involucrado mecanismos dependientes de clatrina e independientes de clatrina (9). Luego de la fisión la clatrina se desensambla y el gránulo vaciado, de menor tamaño, viaja a lo profundo de la célula para fusionarse a endosomas o lisosomas (10) y reentrar al ciclo de exocitosis después de ser dirigido al aparato de Golgi (11) [28].

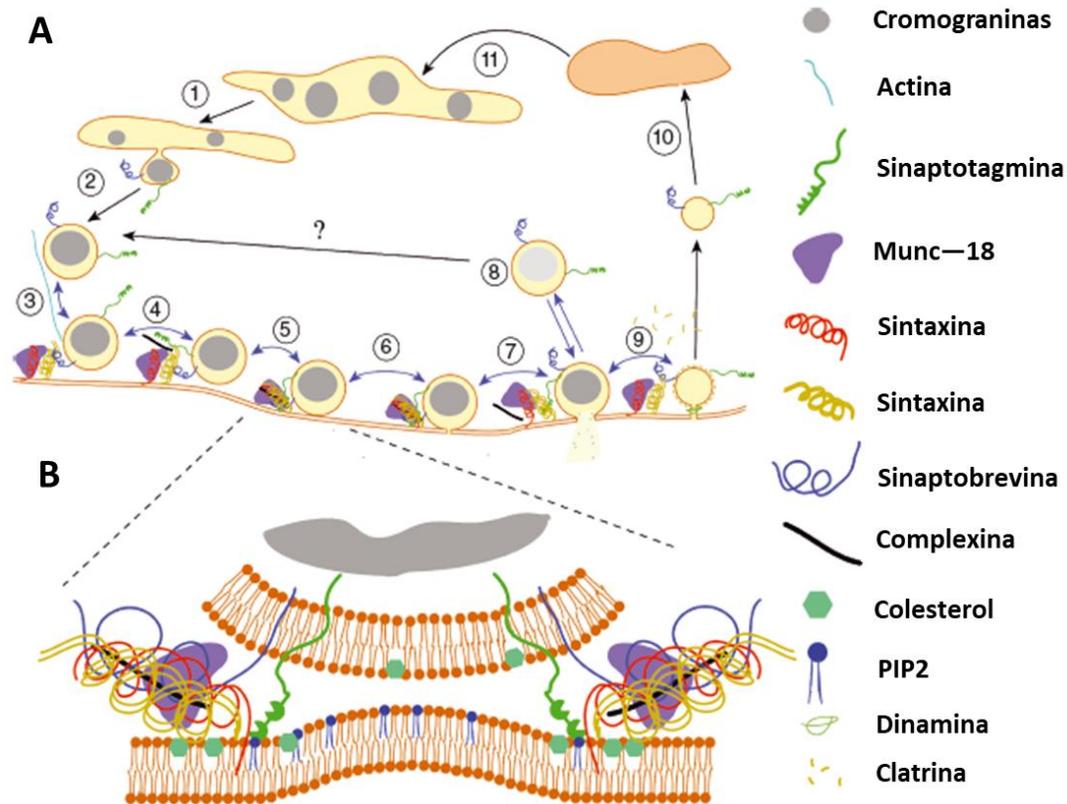


Figura 8. Proceso de exocitosis de catecolaminas en células cromafines adrenales. **A.** La exocitosis de CAs es un proceso complejo que depende de varios pasos en los que intervienen proteínas que en conjunto conforman la maquinaria de exocitosis. Los gránulos cromafines (GCCs) comienzan a formarse por fisión de vesículas del aparato de Golgi (1 y 2) que son transportadas hasta el subplasmalema por actina (3). Luego el GCC pasa por los estados de docking (4), priming (5) y fusión (6) para liberar luego su contenido de manera total (7) o parcial (8). Lo que queda del GCCs es reciclado por endocitosis (9) y probablemente se reintegre después a la maquinaria secretora de nuevo (10 y 11). **B.** Organización del complejo SNARE durante el estado priming. En este estado solo basta que iones de Ca^{2+} contacten sus sitios de unión en la sinaptotagmina para desencadenar la fusión de membranas que llevará a la liberación del material vesicular al exterior. La presencia de colesterol y fosfolípidos facilitan la curvatura de la membrana plasmática que permite acercarla al gránulo. Tomado y adaptado de [28].

2.2 Acoplamiento estímulo–secreción y la función del Ca^{2+}

El acoplamiento estímulo–secreción hace referencia al mecanismo por el cual la llegada de un *estímulo* a las CCs resulta en la *secreción* de CAs. En 1961, W.W Douglas y R. P. Rubin comprobaron que la secreción de CAs de la médula adrenal estimulada por la acetilcolina (ACh) se produce siempre que haya disponibilidad de Ca^{2+} en el medio extracelular [63]. En 1981, Llinás y colaboradores descubrieron que la secreción de neurotransmisor desde la terminal presináptica del axón gigante de calamar está precedida por la entrada de Ca^{2+} en la terminal a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaV) tipo P/Q [64]. Hoy se sabe que la liberación de acetilcolina (ACh) desde las terminales espláncnicas que inervan la médula adrenal activa receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) [78] y muscarínicos (mAChRs) [77] insertados en la membrana plasmática de las CCs, lo que resulta en la despolarización de la membrana plasmática y la generación de PAs. Cada PA tiene una fase de depolarización en la que se abren los CaVs, y cuya apertura permite la entrada de iones Ca^{2+} a la célula produciendo cambios transitorios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Especialmente, se distinguen dos señales intracelulares de Ca^{2+} se dan luego de la estimulación de las CCs: los microdominios de *alto* Ca^{2+} (HCMDs) que ocurren en el subplasmalema en la proximidad de los CaVs como resultado de la entrada rápida del ion y que media la exocitosis rápida de CAs; y, los microdominios de *bajo* Ca^{2+} (LCMDs), que ocurren en regiones adentro de la célula y que permiten el transporte de nuevos GCs para remplazar aquellos que se liberaron en el ciclo de exocitosis previo, reabasteciendo así la maquinaria secretora [59]. Los HCMDs son disipados por la acción de organelos como el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias que, luego de secuestrar el Ca^{2+} , lo liberan de vuelta hacia el citosol para formar así los LCMDs. Finalmente, el Ca^{2+} de los LCMDs es evacuado rápidamente afuera de la célula a través de bombas y transportadores insertados en la MP, con lo que termina la señalización de Ca^{2+} involucrada en el ciclo de exocitosis [75].

Luego de estos hallazgos, buena parte del estudio de la biología celular de las CCs se ha centrado en entender cómo la *entrada* de Ca^{2+} a través de los CaVs y la subsecuente *redistribución* y *liberación* de Ca^{2+} hacia y desde depósitos intracelulares como el RE y las mitocondrias, regulan la movilización del Ca^{2+} citosólico disponible para la secreción de CAs garantizando al tiempo la viabilidad celular y el adecuado desempeño de otras funciones celulares basales como la replicación, la transcripción, etc. La MP, el RE y las mitocondrias conforman lo que se ha denominado la “triada funcional”, un elaborado mecanismo celular presente en CCs adrenales que controla la cantidad de Ca^{2+} liberado al citosol que será usado para la secreción [66] [67].

2.2.2 Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaVs) de las CCs adrenales

Para que la llegada de un estímulo a la médula adrenal resulte en secreción de CAs se requiere, en primer lugar y necesariamente, que el Ca^{2+} extracelular ingrese a las CCs adrenales. Esta entrada de Ca^{2+} se realiza a través de proteínas especializadas que selectivamente transportan Ca^{2+} a favor de su gradiente electroquímico tras cambios en el voltaje de la membrana plasmática (V_m), lo que conduce a la formación de corrientes de Ca^{2+} (I_{Ca}). Las CCs adrenales presentan varios tipos de I_{Ca} mediadas por distintas isoformas de CaVs: I_{Ca} tipo L (transportada por las isoformas Cav1.2 y Cav1.3); I_{Ca} tipo P/Q (Cav2.1); I_{Ca} tipo N (Cav2.2); I_{Ca} tipo R (Cav2.3); y I_{Ca} tipo T (Cav3.1 y Cav3.2). Estudios electrofisiológicos comparativos han demostrado que la densidad de estas corrientes varía entre las CCs de las distintas especies animales [65] (figura 9). Por ejemplo, los canales de Ca^{2+} tipo L transportan aproximadamente el 50% de la densidad de I_{Ca} total en CCs de ratón [69], rata [70] y gato [68] mientras que en cerdo, bovino y humano esta corriente solo representa el 10-20% de la I_{Ca} total. Por su parte, los canales de Ca^{2+} tipo P/Q transportan más de la mitad de la densidad de I_{Ca} en CCs de humano [73] y bovino [72], pero en cerdo, gato, rata y ratón la misma corriente no representa más del 15-20% del total de I_{Ca} . Los canales de Ca^{2+} tipo N son responsables de $\approx 80\%$ de la densidad de I_{Ca} total en CCs adrenales de porcinos [71], del $\approx 45\%$ de la I_{Ca} total en CCs de gato y de 20-30% en rata, bovino, humano y ratón. Finalmente, se ha encontrado expresión funcional de canales de Ca^{2+} tipo R en CCs de ratón y rata en donde transportan el $\approx 10\%$ de la I_{Ca} total, sin embargo, no hay ninguna fracción de esta corriente en las CCs de los restantes modelos animales en comparación (figura 9).

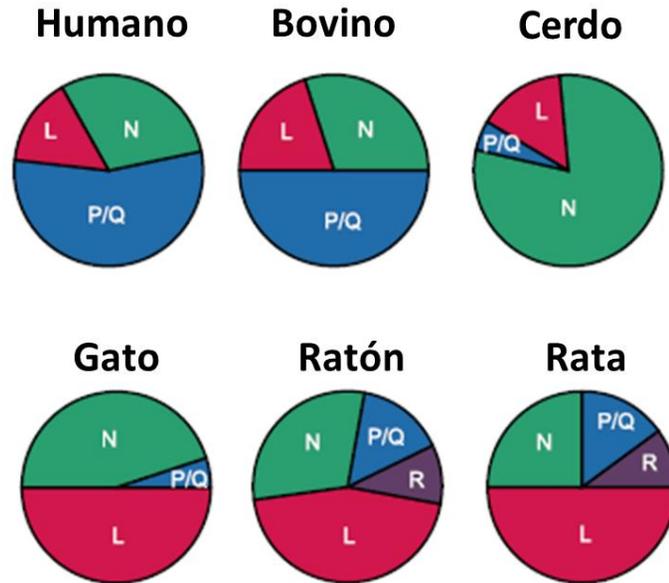


Figura 9. Densidad de corrientes de Ca²⁺ activadas por voltaje en células cromafines de distintas especies de mamífero. La corriente total de Ca²⁺ gatillada por variaciones en el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática en CCs es transportada por diferentes isoformas de canales de Ca²⁺ operados por voltaje (CaVs) y varían en función de la especie de mamífero de la que procedan. Tomado y adaptado de [65].

Tomando lo anterior, las fracciones que componen la I_{Ca} total en CCs de rata son: 50% de I_{Ca} tipo L, 25% de I_{Ca} tipo N, 15% de I_{Ca} tipo P/Q y 10% de I_{Ca} tipo R [70].

Los canales de Ca²⁺ tipo L (long lasting) presentan escasa inactivación al despolarizar la membrana ($\tau > 500$ ms) y son relativamente resistentes a potenciales de mantenimiento despolarizados. Son sensibles a las dihidropiridinas (DHP) tanto agonistas (BAY K 8644) como antagonistas (nifedipina, nisoldipina, nimodipina, furnidipina, nitrendipina). Son también inhibidos por drogas como el verapamilo y el diltiazem [65]. Por su parte, los canales de Ca²⁺ tipo N se inactivan más rápidamente que los canales tipo L, de manera dependiente del voltaje, y presentan un efecto inhibitorio a potenciales de mantenimiento despolarizados. Son bloqueados irreversiblemente por la toxina ω -conotoxina GVIA del caracol geógrafo marino *Conus geographus* y de manera reversible por la toxina ω -conotoxina MVIIA del caracol marino "cono de mago" *Conus magus*. Los canales de Ca²⁺ tipo P fueron descubiertos por R. Llinás en el cerebelo y son resistentes al bloqueo por DHPs y la toxina ω -conotoxina GVIA. No obstante, fue posible aislar e identificar estos canales gracias a su sensibilidad a la toxina FTX de la araña gigante red de embudo [74]. Electrofisiológicamente, estos canales son insensibles a potenciales de mantenimiento despolarizados y no presentan inactivación ante pasos de voltaje despolarizantes [65]. Finalmente, las corrientes tipo R (resistente), sensibles a la toxina SNX-482 de la tarántula *Hysteroocrates gigas*, se ha identificado en CCs de rata y ratón. Los

canales tipo R se inactivan rápidamente luego del paso de despolarización y son altamente sensibles al bloqueo por Ni^{2+} y Cd^{2+} .

Se desconoce la importancia fisiológica de la marcada diferencia en la expresión de las distintas isoformas de CaVs en CCs de las especies estudiadas hasta hoy, pero se supone que esto tiene consecuencias en el control fino de la exocitosis diferencial de EPI o NE ante diferentes estresores. La situación se hace más compleja si se tiene en cuenta que las CCs también expresan canales de Ca^{2+} operados por depósitos intracelulares de Ca^{2+} y canales de Ca^{2+} activados por ligandos, pero dicha discusión va más allá del propósito de este proyecto.

2.2.3 El retículo endoplásmico y su papel en la regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Una vez que el Ca^{2+} ingresa a la célula tras una despolarización de la membrana plasmática se generan microdominios de alto Ca^{2+} (HCMDs) que son regulados por cuatro mecanismos principales: **i.** la captación de Ca^{2+} y su liberación desde el retículo endoplásmico (RE); **ii.** el secuestro de Ca^{2+} y su liberación desde las mitocondrias; **iii.** la unión a proteínas de unión a Ca^{2+} , también llamados amortiguadores de Ca^{2+} ; y, **iv.** el bombeo de Ca^{2+} hacia el exterior por parte de la bomba ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA). Como se mencionó previamente, la membrana plasmática con los CaVs allí insertados; el RE con los receptores de rianodina (RyR) y la bomba SERCA; y las mitocondrias con el transportador uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) y el intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+} - \text{Li}^+$ (NCLX), forman en conjunto una asociación funcional indisoluble denominada la "triada funcional" (TF).

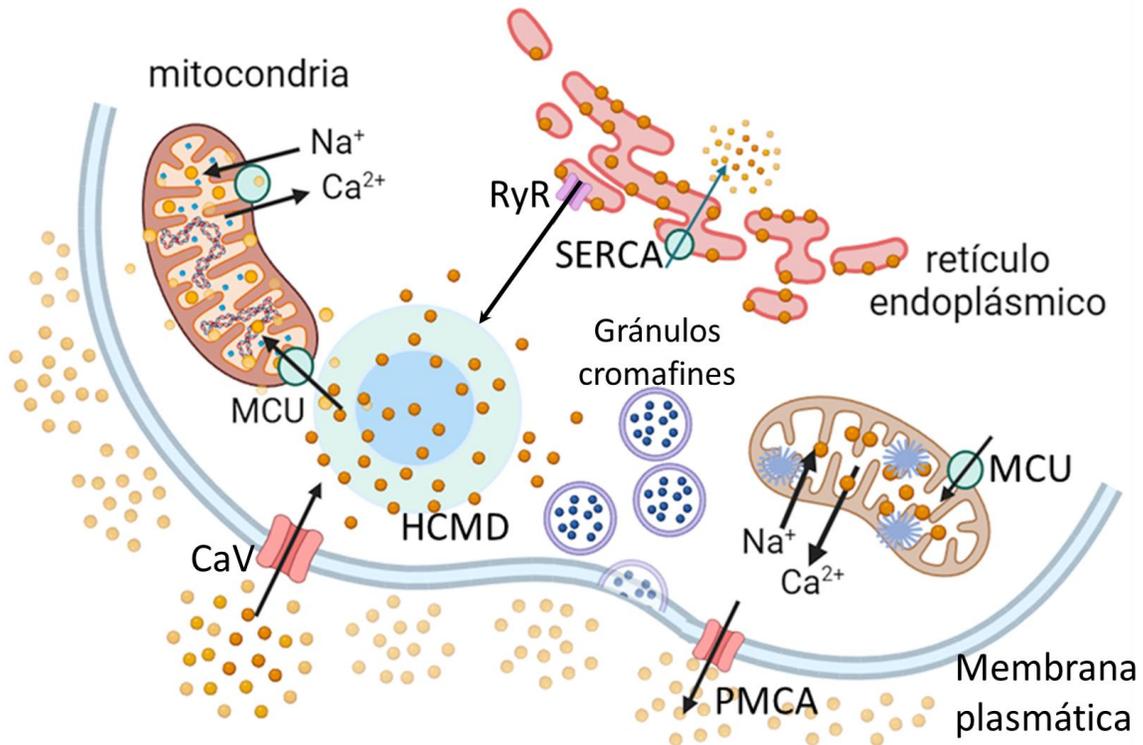


Figura 10. Componentes de la "triada funcional" de manejo de $[Ca^{2+}]_i$ en las células cromafines. Para que las CCs secreten CAs es necesaria la formación de microdominios de alto Ca^{2+} (HCMD) en el subplasmalema. Los HCMD están moldeados por la acción orquestada de tres actores: un gatillador, un amplificador y un atenuador de la señal de Ca^{2+} . El gatillo de la señal de Ca^{2+} son los CaVs en la MP. Quien amplifica la señal de Ca^{2+} en el citosol son los RyR insertados en la membrana del RE. Finalmente, para evitar que el Ca^{2+} viaje a regiones adentro de la célula donde no se necesita, la señal de Ca^{2+} es atenuada por la acción del MCU en la mitocondria, que es un depósito de baja afinidad, pero de alta capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} . Imagen elaborada en Biorender, por Angélica Martínez B. basada en [67].

La bomba de Ca^{2+} del retículo sarco-endoplásmico (SERCA) transporta Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del RE cuando la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta. Este descubrimiento llevó al establecimiento de RE como un importante reservorio intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_{RE}$) tanto en células excitables como no excitables [76]. La liberación de Ca^{2+} desde el RE se realiza por medio de dos canales iónicos intracelulares activados por ligando: el receptor de IP_3 (IP_3R) y el receptor de rianodina (RyR). El IP_3R se abre tras la unión de IP_3 que se genera por la activación de receptores acoplados a proteína G (RAPG). El mAChRs en la membrana plasmática de CCs es un RAPG [77]. La unión de agonistas al mAChR activa una cascada de señalización intracelular que conlleva la activación de la enzima fosfolipasa C (PLC). La PLC cataliza el rompimiento de fosfoinositol bifosfato (PIP_2) en la bicapa lipídica de la membrana plasmática para producir diacilglicerol (DAG) e IP_3 , el cual se une a su receptor en el RE para liberar Ca^{2+} del depósito.

Por su parte, el RyR se abre tras la unión de iones Ca^{2+} luego de que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta en el citosol. La unión de Ca^{2+} al RyR libera más Ca^{2+} aumentando así la ganancia del mecanismo de amplificación de la señal de Ca^{2+} , mecanismo denominado “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ” (CICR, por sus siglas en inglés).

2.2.4 Regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por las mitocondrias

Experimentos en CCs realizados por el grupo de B. Hille demostraron que las mitocondrias acumulan y liberan Ca^{2+} desde y hacia el citosol cuando las células son estimuladas [79] [168]. Este intercambio produce transitorios de Ca^{2+} ($t-[\text{Ca}^{2+}]$) mitocondrial cuya magnitud puede ser del orden de décimas de milimolar [80]. La respuesta de la mitocondria al $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevado se da por el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) ubicado en la membrana mitocondrial interna. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las inmediaciones del MCU es $> 1 \mu\text{M}$ el canal se abre y el Ca^{2+} es internalizado hacia la matriz aprovechando la alta diferencia de potencial de membrana mitocondrial (V_{mit}), que es de unos -180 mV [82] [84]. El V_{mit} genera la fuerza motriz que le confiere a la mitocondria su alta capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} a la vez que asegura un adecuado funcionamiento de otros procesos como la cadena transportadora de electrones, la síntesis de ATP y la bioenergética celular en general [81]. En otro momento, el Ca^{2+} acumulado por la mitocondria puede ser liberado al citosol principalmente por el intercambiador de $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}-\text{Li}^+$ (NCLX). El intercambiador NCLX aprovecha la alta concentración de Na^+ en el citosol respecto a la matriz mitocondrial como fuerza motriz para impulsar la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria. Para que el intercambiador NCLX siga funcionando, el Na^+ que ingresa a la matriz mitocondrial debe ser extruido rápidamente hacia el citosol por el intercambiador Na^+-H^+ [84]. Aunque el intercambiador NCLX funciona normalmente como una vía de extrusión de Ca^{2+} , puede actuar en modo reverso si el V_{mit} se disipa y el gradiente de Na^+ se invierte [82] [83] [85].

2.2.5 Contribución de la membrana plasmática, el RE y la mitocondria a la regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs de CCs de ratón y bovino

La membrana plasmática el RE y las mitocondrias actuando por medio de sus componentes moleculares en la regulación del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en las CCs conforman lo que se ha denominado la “triada funcional” (TF) [66] [67] [85] [88]. El concepto de TF reviste fundamental importancia en el entendimiento del fenómeno estímulo–secreción pues sus componentes ejecutan un sofisticado y complejo mecanismo celular que regula finamente la cantidad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disponible para la exocitosis de CAs en CCs. Aunque la contribución

específica de cada componente de la TF a la señal de $[Ca^{2+}]_i$ está definida por la especie, de manera muy general la TF trabaja así: tras la activación de las CCs y la consecuente despolarización de la membrana plasmática se produce la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de los CaVs. El Ca^{2+} entrante activa los RyRs del RE estimulando así la liberación de Ca^{2+} por medio del mecanismo de CICR, lo que amplifica la señal de Ca^{2+} . Ambos fenómenos: la entrada de Ca^{2+} y su amplificación por el RE, contribuyen a la generación de los microdominios de alto Ca^{2+} (HCMD) que se necesitan para la liberación de CAs. Las mitocondrias cercanas a la membrana plasmática, por su parte, consumen gran parte de ese incremento de Ca^{2+} en el citosol (i.e $[Ca^{2+}]_i$) actuando, así, como una barrera que impide el paso de la onda de Ca^{2+} hacia regiones más hacia el interior de la célula, como el núcleo, en donde no se requieren tales concentraciones del ión. Así, la TF la conforman un gatillador de la señal de Ca^{2+} (los CaVs en la MP), un amplificador de la señal de Ca^{2+} (los RyRs en el RE) y una barrera de contención espacial de la señal Ca^{2+} (el MCU de las mitocondrias) para evitar que el ión alcance regiones intracelulares donde no se necesita [66] [67] [85] [88].

La contribución específica de los elementos que conforman la TF a la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs luego de la despolarización de la membrana plasmática es radicalmente diferente en CCs de ratón (CCM) y bovino (CCB). Sin intervención farmacológica, esto es, solo despolarizando la membrana plasmática, la secreción de CAs en CCM y CCB es similar, aunque las señales transitorias de Ca^{2+} ($t-[Ca^{2+}]_i$) en CCB son más duraderas y de mayor amplitud que los $t-[Ca^{2+}]_i$ en CCM. No obstante, la situación es diferente cuando se realizan intervenciones farmacológicas para evaluar la contribución que tienen los depósitos intracelulares de Ca^{2+} a la señal de $[Ca^{2+}]_i$ y, por extensión, a la secreción de CAs. Por ejemplo, la aplicación de los protonóforos cianuro de carbonilo m-(cloro) fenilhidrazona (CCCP) y el cianuro de carbonilo p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP), que disipan el V_{mit} , deberían suprimir la captación de $[Ca^{2+}]_i$ de la mitocondria al detener la actividad del MCU. Con una menor amortiguación del $[Ca^{2+}]_i$ por parte de las mitocondrias, la consecuencia inmediata ante la despolarización de la membrana plasmática debería ser que las señales de $[Ca^{2+}]_i$ se vieran potenciadas. No obstante, en CCM tratadas con CCCP la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]_i$ disminuye 48% y su respuesta secretora se reduce 51%, probablemente debido a la actividad en modo reverso del NCLX una vez disipado el V_{mit} [89]. Por el contrario, ante el mismo tratamiento con CCCP, la respuesta al $[Ca^{2+}]_i$ de las mitocondrias en CCB es diferente: se observa un incremento tanto en la amplitud como en el curso temporal de los $t-[Ca^{2+}]_i$ y un correspondiente aumento en su respuesta secretora [90]. Estas disparidades en la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ sugieren que las mitocondrias en CCM y en CCB tienen funciones diametralmente opuestas en el control del $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs.

Por su parte, en cuanto a la participación del RE, en una publicación reciente de

Martínez–Ramírez et al. [91] se comparó el efecto de la inhibición reversible de la bomba SERCA del RE sobre los $t-[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs de CCM y CCB luego de su estimulación con ACh. La supresión reversible de la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE la realizaron mediante la aplicación de ácido ciclopiazónico (CPA), una micotoxina que bloquea la actividad de la bomba SERCA de manera reversible [93] [94]. En su estudio, Martínez–Ramírez et al. mostraron que tras la aplicación de CPA se presentó un incremento en la exocitosis de CAs inducida con ACh en CCM y una disminución en CCB (figura 11A, C). Al lavar el CPA y aplicar nuevamente ACh, la secreción de CAs disminuyó en CCM y aumentó en CCB. En ambos casos la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]_i$ disminuyó ligeramente después del tratamiento con CPA, sin que la diferencia fuera significativa (figura 11B, D). Una pregunta necesaria ante este escenario es: ¿cómo puede la inhibición reversible de SERCA por CPA afectar la exocitosis de CAs en CCMs y CCBs de manera tan distinta? Dado que el CPA únicamente bloquea la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE y no la respuesta de las mitocondrias ni la MP, una explicación válida a dicha discrepancia es que el manejo del Ca^{2+} por el RE es diferente en las CCs de una especie y la otra. ¿De qué manera? Una interpretación es que el RE en CCM tiene un alto poder amortiguador del $[Ca^{2+}]_i$, funcionando como un *sumidero de Ca^{2+}* , a la vez que presenta un *débil* mecanismo de CICR. Lo contrario sería válido para las CCB, en cuyo caso el RE se comportaría como un *surtidor de Ca^{2+}* con un *fuerte* mecanismo de CICR y una captación pobre de Ca^{2+} [92].

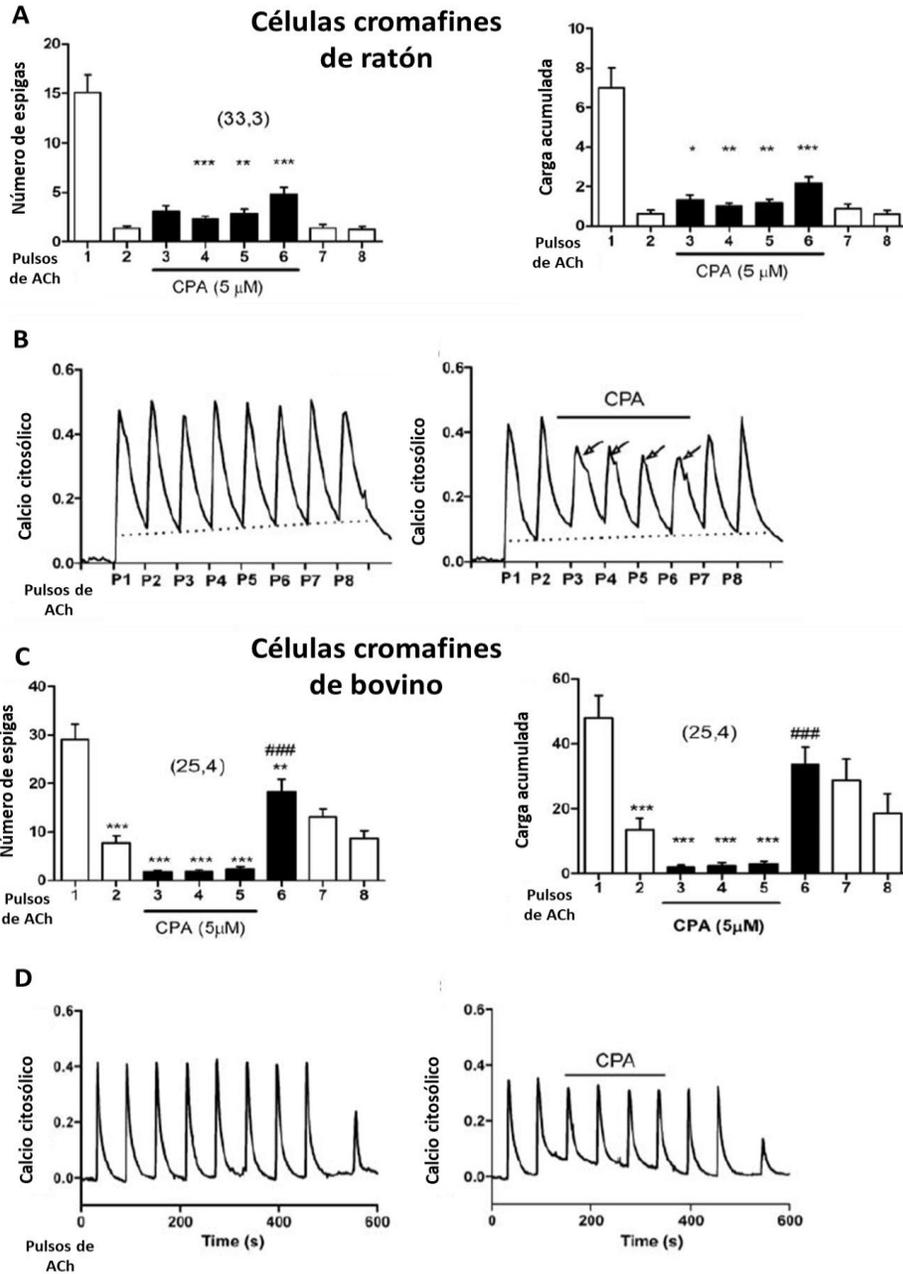


Figura 11. Efecto del CPA sobre la exocitosis de catecolaminas y las señales de $[Ca^{2+}]_i$ de células cromafines de ratón y de bovino. A. En CCs de ratón (CCM), el CPA facilita la liberación de CAs al aumentar el número de espigas y la carga amperométrica acumulada. **B.** Paradójicamente, en lugar de aumentar, el CPA disminuye la señal de $[Ca^{2+}]_i$ en estas mismas células. **C.** En contraste, el CPA disminuye la secreción de CAs en CCs de bovino (CCB) al reducir el número de descargas amperométricas y la carga acumulada asociada. **D.** Sin embargo, el CPA reduce imperceptiblemente la señal de $[Ca^{2+}]_i$ en estas células. Tomado y adaptado de [91].

2.3 Eliminación de EPI y NE del espacio extracelular

La acción fisiológica de las CAs en el organismo animal finaliza por dos mecanismos principales: transporte activo a través de la membrana plasmática y actividad de enzimas citoplasmáticas; procesos que tienen que ver con la entrada de CAs a las células de ciertos tejidos y su catabolismo por enzimas citosólicas en su interior. No obstante, la mayoría de CAs que entran de regreso a las CCs o algunas neuronas se unen de nuevo al ciclo de exocitosis formando parte del *pool* de reserva que luego restituirá al PLL.

Los transportadores que translocan CAs a través de la membrana plasmática están distribuidos de manera neuronal y extraneuronal [62]. En neuronas, el 90% de la NE liberada en la sinapsis es recapturada por el transportador de NE neuronal localizado en la membrana presináptica. La NE restante desaparece por difusión. Por su parte, la EPI liberada por las CCs es removida de la sangre circulante por la acción del transportador de monoaminas extraneuronal. Tanto las neuronas como las CCs expresan en su citosol la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) cuyos sustratos incluyen las CAs: DA, EPI y NE. Esta enzima convierte la EPI en metanefrina (MN) y la NE en normetanefrina (NMN). Alrededor del 90% de MN y 25% de NMN circulante en plasma es liberada desde la médula adrenal al procesar las CAs que se fugan de los GCC hacia el citosol de las CCs [61]. El 10% restante de MN circulante procede de tejidos extra adrenales que expresan algunas cantidades de COMT. Las CAs circulantes que escapan a la acción enzimática de la COMT son excretadas por los riñones, al igual que sus metabolitos resultantes MN y NMN [28].

Capítulo 3

3. Evidencia de una hipersecreción de CAs en la hipertensión arterial

La hipertensión arterial (HTA) constituye el principal factor de riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV) en hombres y mujeres de todas las edades, etnias, razas y países independientemente de otros factores de riesgo. A pesar de los avances en el entendimiento de la fisiopatología de la HTA esencial y al desarrollo de fármacos para su control en la mayoría de los pacientes, poco se conoce sobre su génesis y en muchos países continúa siendo el principal factor modificable para prevenir casos de ECV [96]. La HTA es una enfermedad compleja y multifactorial. Además del ampliamente reconocido control renal de la tensión arterial (TA) y su papel en la fisiopatología de la enfermedad, otras hipótesis han emergido en el tiempo para explicar el complejo fenómeno del control de la TA y cómo su desregulación conduce a la HTA. Una de ellas es la "hipótesis adrenérgica" del origen de la HTA [136], en la que se explica que la aparición de la HTA podría ser el resultado de defectos en los mecanismos que regulan la secreción de NE en las terminales simpáticas y de EPI en la médula adrenal que conducirían a concentraciones plasmáticas anormalmente altas de estas catecolaminas [127] [128] [129] [130] [131] [139]. De hecho, algunos fenotipos hipertensivos pueden ser explicados solo por la acción catecolaminérgica, sin intervención renal en absoluto [96]. De igual forma, algunos casos de HTA solo responden a tratamientos que bloquean la acción sistémica de las CAs [134] [135].

Como ya se mencionó, las principales fuentes de estas CAs en el organismo son el sistema nervioso simpático y la médula adrenal, por lo que entender la biología celular de las CCs y el desarrollo de su fenotipo hipersecretor de CAs en modelos animales de HTA es esencial, como veremos a continuación.

3.1 La hipertensión arterial

La ECV es de lejos la principal causa de muerte en el mundo y la HTA su principal factor de riesgo. Se estima que alrededor de 1.13 billones de personas sufren de HTA en el globo terráqueo y de estos 10.4 millones mueren cada año como consecuencia de su padecimiento. En México, con una población de casi 130 millones de habitantes, se estima que existe una

prevalencia de HTA del 24.1% de los cuales 18.4% están formalmente diagnosticados por un profesional de la salud. El 50% de los pacientes diagnosticados con HTA recibe tratamiento antihipertensivo, y de estos, el 50% se adhiere al tratamiento y casi todos, un 49.9%, tiene un control efectivo de los niveles de HTA hacia valores normales [95]. Estas estadísticas justifican el estudio de la HTA desde sus fundamentos fisiopatológicos mediante la ciencia básica hasta sus manifestaciones epidemiológicas mediante estudios clínicos y farmacológicos, con el propósito de controlar un padecimiento creciente en la población que representa un alto costo a los sistemas de salud de los gobiernos.

De acuerdo con su etiología, la HTA se clasifica en dos grupos: HTA esencial y HTA secundaria. La HTA esencial, primaria, o idiopática, se define como una TA alta en la que causas secundarias como la enfermedad renovascular, falla renal, feocromocitoma, aldosteronismo u otras causas de HTA no están presentes [133]. Es la forma de HTA que sufren el 95% de los pacientes y se caracteriza por ser un desorden heterogéneo en el que los pacientes que la padecen presentan diferentes factores causales en muchos casos desconocidos.

Aunque no se tiene claro en qué valores de TA aparecen las primeras manifestaciones cardiovasculares y renales, una definición para la HTA resulta útil para tomar decisiones sobre el tratamiento y evitar las consecuencias de padecerla. La clasificación de la TA aceptada en la actualidad en humanos establece 4 estadios [97]:

Tabla 1. Clasificación de la HTA de acuerdo con la unión nacional para la prevención, detección, evaluación y tratamiento de la HTA—VII (JNC—VII).

Clasificación TA	TA sistólica (mm Hg)	TA diastólica (mm Hg)
Normal	<120	<80
Pre-HTA	120–139	80–89
HTA etapa 1	140–159	90–99
HTA etapa 2	≥160	≥100

La TA se define como la fuerza que ejerce el volumen de sangre bombeado por el corazón por minuto sobre la superficie parietal de los vasos sanguíneos arteriales por donde el fluido se desplaza [25]. Una medida de la cantidad de sangre bombeada por minuto es el gasto cardiaco (GC), que es un parámetro que varía en función de las circunstancias y que resulta del producto de la frecuencia cardiaca (FC) multiplicada por el volumen de sangre bombeado por el corazón a la circulación sistémica en una contracción sistólica, el así llamado volumen sistólico (VS).

$$GC = FC \times VS$$

Ec. 1

De manera que el GC varía de manera directamente proporcional a la FC y al VS. Por su parte, la vasculatura arterial periférica, compuesta por segmentos con vasos sanguíneos de diferentes diámetros (arterias, arteriolas, capilares arteriales) y en virtud de la musculatura vascular asociada a cada tramo, contrapone una resistencia variable al paso del fluido bombeado por el corazón. La resistencia vascular periférica (RVP) es igual a la suma de las resistencias de cada segmento vascular (Rseg). A su vez, la Rseg de cada transecto dependerá del radio (r) del vaso arterial, su longitud (l) y la viscosidad de la sangre (η) que allí se desplaza; parámetros que se relacionan en las siguientes expresiones:

$$RVP = Rseg1 + Rseg2 + \dots RsegN$$

$$Rseg = \frac{8 \eta l}{\pi r^4}$$

Ec. 2

Así, si se mantiene constante η y l, como es común si no hay alteraciones patológicas, la Rseg y, por tanto, la RVP, dependerán en última instancia del r del vaso en cuestión. El r de los vasos sanguíneos es variable y sujeto de regulación en virtud de su capa muscular con receptores a neurotransmisores y hormonas, la cual puede contraerse o relajarse para reducir o aumentar el r del vaso y, como consecuencia, para incrementar o disminuir la Rseg, respectivamente.

Tanto el GC como la RVP se relacionan con la TA mediante la siguiente relación aritmética:

$$TA = GC \times RVP$$

Ec. 3

De la expresión se deduce que incrementos en el GC o en la RVP conducirán a un aumento de la TA. Tanto el GC como la RVP son las dos variables que fisiológicamente son reguladas por los sistemas de control de la TA locales, humorales, neurales y renales con el fin de mantener este parámetro dentro de valores que permitan el suministro adecuado de O_2 y nutrientes a los tejidos y órganos del cuerpo para así garantizar la homeostasis ante diferentes circunstancias.

3.2 El modelo de rata espontáneamente hipertensa (SHR)

Uno de los modelos animales más ampliamente utilizado en el estudio de la génesis y la fisiopatología de la hipertensión arterial (HTA) humana es la rata espontáneamente hipertensa (SHR), y su contraparte genética, la rata Wistar-Kyoto (WKY) normotensa. Al igual que en los humanos, las ratas SHR desarrollan HTA esencial con la edad: en la semana 6–9 de edad la TA sistólica está por arriba de los 150 mmHg y hacia la semana 15 de edad alcanza los 200 mmHg [98]. Desde la generación del modelo en 1963 [99], existen a la fecha más de 20 mil publicaciones [100] en las que se emplea la rata SHR para estudiar diferentes aspectos del origen y la fisiopatología hipertensiva. Se ha logrado demostrar experimentalmente, por ejemplo, que con respecto a su contraparte normotensa WKY, las ratas SHR tienen mayores concentraciones plasmáticas de CAs, como adrenalina (EPI) y noradrenalina (NE) [101] [102], como consecuencia de una mayor liberación de estas sustancias por parte de la médula adrenal en estas ratas [103]. En concordancia con lo anterior, se ha demostrado que las células cromafines (CCs), que conforman la médula adrenal, presentan una mayor secreción de CAs en ratas SHR con respecto a su contraparte WKY [104]. Así, un exceso de EPI y NE plasmáticas circulantes provenientes de la médula adrenal están, en parte, asociadas a la aparición y desarrollo de la HTA en ratas SHR.

¿Cómo es que un exceso persistente de EPI y NE circulantes en el organismo alteran la PA hasta generar HTA? La acción de las CAs tiene efecto sobre los factores cardíacos y vasculares descritos en la Ec. 3. En cuanto a los efectos cardíacos, se ha demostrado ampliamente que la EPI y NE se une directamente a los receptores β -adrenérgicos β_1 y β_2 en cardiomiocitos (CMs) y células marcapasos en el corazón, en donde se expresan en una proporción 80/20, respectivamente. La unión de NE a β_1 activa la cascada de señalización Gs-adenilato ciclasa-cAMP-proteína quinasa A (PKA) que resulta en la fosforilación de proteínas como troponina cardíaca I, canales de Ca^{2+} tipo L, fosfolamban, receptor de rianodina, entre otras, cuyo resultado final es el incremento en la amplitud de los transitorios de calcio y la contractilidad de los CMs. En las células marcapasos, la activación de β_1 y de PKA conduce a la fosforilación de canales de Ca^{2+} membranales y otras proteínas de manejo de Ca^{2+} incrementando las oscilaciones de Ca^{2+} y así la frecuencia del marcapasos. Entonces la activación de β_1 por EPI o NE en el corazón resulta en el incremento de la fuerza de contracción (contractilidad) y al aumento de la frecuencia cardíaca (FC). Un aumento en la fuerza de contracción del corazón implica un mayor volumen de sangre (VS) bombeado por latido. Así, la EPI y NE incrementan tanto VS como FC en la Ec. 1 que resultan en el incremento del gasto cardíaco (GC). El incremento en GC conduce al aumento de PA en la Ec 3. Así, la acción persistente de EPI y NE en ratas SHR podría conducir con el tiempo a la aparición y desarrollo de HTA. De hecho, en humanos, antagonistas del receptor β_1 (beta-bloqueadores) como el

propranolol se emplean como fármacos antihipertensivos [105].

Los efectos vasculares de las CAs células del músculo liso que conforman la pared de las arterias se expresa el receptor alfa-adrenérgico α_1 , ligando de EPI y NE. Al unir su ligando adrenérgico, el receptor activa dentro de la célula una cascada de señalización que lleva al incremento de la concentración de fosfolipasa C que rompe a PIP2 para producir IP3. El IP3, a su vez, tiene como ligando un canal de Ca^{2+} sobre la membrana del retículo endoplásmico (RE): el receptor de IP3 (IP3R). Una vez activado, el receptor de IP3 dispara la liberación de Ca^{2+} desde el ER hacia el citoplasma, lo que permite la contracción de la célula. Al contraerse la musculatura lisa que rodea las arterias se produce una disminución en su radio y en su diámetro haciendo que disminuya la conductancia vascular (C_v) y aumentando la resistencia (R) del vaso en la Ec. 2. Cuando el incremento de R en la Ec. 2 se da en uno o en todos los segmentos arteriales (arterias, arteriolas, capilares) se produce un aumento de la resistencia vascular periférica (RVP), que en la Ec. 3 conduce a un incremento en la TA. De manera análoga al uso de fármacos beta-bloqueadores para tratar la HTA, los fármacos alfa-bloqueadores como prazosin y urapidil, que bloquean al receptor α_1 , se emplean también como moléculas de primera línea en el tratamiento de eventos hipertensivos al relajar la vasculatura arterial [106].

Así, un incremento persistente en la secreción de CAs por parte de la médula adrenal podría conducir a la aparición y desarrollo de la HTA en ratas SHR al afectar los parámetros fisiológicos descritos en las ecuaciones 1 a 3 que definen formalmente la TA.

III. Planteamiento del problema y preguntas de investigación

Los factores que regulan la exocitosis de neurotransmisores y hormonas y la dinámica de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en células secretoras es un área de estudio efervescente y en constante deliberación. Este trabajo pretende contribuir al entendimiento de los factores involucrados en la regulación de estos dos procesos celulares, específicamente en células cromafines de rata.

Aunque en varias investigaciones se ha ahondado en el estudio de los factores que regulan la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que conducen a la secreción de CAs en las CCs de ratón (*Mus musculus*) y de bovino (*Bos taurus*), se conoce comparativamente poco sobre el manejo de Ca^{2+} citosólico que lleva a la liberación de CAs en CC de la rata (*Rattus norvegicus*). La cercanía filogenética entre el ratón y la rata lleva a asumir que en las CCs de ambas especies se manifiestan mecanismos similares conducentes a la liberación de EPI y NE, idea reforzada por el hecho de que en las CCs de ambas especies se expresan las mismas isoformas de CaVs que transportan fracciones de corriente de Ca^{2+} en cantidades equivalentes (figura 9) en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática. No obstante, las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ conducentes a la exocitosis de CAs en CCs no solo dependen de la entrada de Ca^{2+} a través de los CaVs sino, además, de la acción coordinada de organelos intracelulares como el RE y las mitocondrias implicados también en la dinámica y movilización del ión. Cabe entonces preguntar si la contribución específica de estos organelos a la secreción de CAs es realmente igual entre las dos especies (rata y ratón). En este trabajo nos enfocamos en estudiar, bajo diferentes condiciones experimentales, la contribución de la movilización de Ca^{2+} por el RE al establecimiento de las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en CCs de rata. La pregunta central es determinar si ante un estímulo eléctrico que lleve a la apertura de los CaVs, el RE en CCs de rata se comporta como un *sumidero* de Ca^{2+} que deprime la liberación de CAs o, por el contrario, lo hace como una *fuentes* de Ca^{2+} que alimenta y potencia la maquinaria secretora. Entender el papel del RE en la secreción de CAs en las CCs de rata puede ser relevante en el contexto de condiciones patológicas como la hipertensión arterial (HTA) esencial.

El estudio de la contribución del RE a la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y exocitosis de CAs en las CCs de rata también tiene relevancia por el papel que estos dos procesos celulares tienen en el contexto de la HTA esencial. La rata espontáneamente hipertensa (SHR) es un modelo animal de HTA esencial ampliamente utilizado. Comparada con su contraparte normotensa, las ratas Wistar Kyoto (WKY), las CCs de las ratas SHR presentan un fenotipo hipersecretor de CAs que se debe, en parte, a una liberación exacerbada de Ca^{2+} desde el RE promovida por el

mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) [104]. Las razones de una liberación exacerbada de Ca^{2+} por el RE en las CCs de ratas SHR podrían ser: i. mayor concentración de Ca^{2+} en el RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$); ii. mayor número de receptores de rianodina en el RE; iii. mayor afinidad de los RyR por Ca^{2+} . Se sabe que una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ alta hace que el RE se comporte como una *fuentes* de Ca^{2+} ante un estímulo despolarizante, mientras que una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ baja lleva a que este organelo se comporte como un *sumidero* de Ca^{2+} . Por tanto, una estrategia para entender el papel del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en el fenotipo hipersecretor de CAs en las CCs de ratas SHR es determinar, bajo condiciones de Ca^{2+} normal o disminuido, el comportamiento del RE en las CCs de una y otra cepa de rata ante un estímulo despolarizante. Si la aparición del fenotipo hipersecretor resulta de una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ alta, entonces el RE en CCs de ratas SHR debería comportarse como una *fuentes* de Ca^{2+} que potencia la secreción de CAs por el mecanismo de CICR. En cambio, si el RE de las CCs de ratas WKY tiene una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ baja debería comportarse como un *sumidero* de Ca^{2+} que deprime la respuesta secretora. Ante la circunstancia de que el RE de las CCs de *ambas cepas* de rata se comporte como una *fuentes* de Ca^{2+} , será posible inferir la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ *relativa* en una y otra cepa realizando maniobras experimentales que permitan medir en qué medida es atenuada la señal de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) cuando se suprime la capacidad del RE para liberar Ca^{2+} después que se han abierto los CaVs ante un estímulo: si la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ es *más alta* en CCs de rata SHR —como se esperaría— entonces la *atenuación* de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ causada por el bloqueo de la liberación de Ca^{2+} del RE sería *mayor* en estas células que en las de su contraparte WKY.

Dilucidar el trasfondo que conduce a la aparición del fenotipo hipersecretor de CAs en las CCs de ratas SHR es de enorme importancia para el entendimiento de la fisiopatología hipertensiva.

En resumen, con esta investigación buscamos abordar dos problemas: i. la contribución de la movilización de Ca^{2+} por el RE a la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la liberación estimulada de CAs en CCs de rata; y, ii. comparar la contribución del RE a la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y exocitosis de CAs en dos cepas de la misma especie de rata: las ratas SHR y las ratas WKY. Con base en los aspectos previamente tratados, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Cómo afecta la inhibición reversible de la captación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico por CPA la exocitosis de catecolaminas de células cromafines de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y normotensas (WKY)?
2. ¿El efecto del CPA sobre la exocitosis de células cromafines de rata, es parecido al efecto que se ha observado en células cromafines de bovino o es como el que se ha visto en células cromafines en ratón?
3. ¿Existe un efecto diferencial del CPA sobre los transitorios de Ca^{2+} inducidos por la despolarización en células cromafines de ratas espontáneamente hipertensas con respecto a su contraparte normotensa?

IV. Justificación

La rata espontáneamente hipertensa (SHR) es quizá el modelo animal de hipertensión arterial (HTA) más estudiado hasta hoy. Tan solo en la última década se han publicado casi 4 mil trabajos alrededor del mundo en los que se estudia el origen y los determinantes fisiopatológicos de la HTA en estos animales [100], cuyo padecimiento es similar al que se observa en seres humanos. Y no es para menos. Alrededor de 1.13 billones de personas sufren de HTA en el mundo y de estos 10.4 millones mueren cada año como consecuencia de su padecimiento. En México, se calcula una prevalencia de HTA del 24.1% y se estima que tan solo el 50% de pacientes que reciben tratamiento se adhiere a él [95]. La otra mitad de pacientes en los que los tratamientos convencionales son inocuos no hay un control efectivo de la enfermedad y poco se conoce sobre la resistencia farmacológica que presentan, lo que hace necesario realizar estudios que permitan entender mejor este padecimiento que sin un tratamiento oportuno y adecuado es fatal.

La rata SHR es un modelo animal de HTA. Desde su nacimiento y hasta la semana 9-10 de vida las ratas SHR presentan valores normales de TA. Sin embargo, después de este periodo se empiezan a observar incrementos persistentes en la TA que se acompañan de concentraciones plasmáticas anormalmente altas de CAs asociadas con la aparición de la enfermedad [98] [101] [102]; como sucede en seres humanos con el mismo padecimiento [127] [128] [129] [130] [131].

El exceso de CAs plasmáticas en ratas SHR se explica, en parte, por la aparición de un fenotipo hipersecretor de CAs en las CCs de la médula adrenal [104], que se comienza a presentar incluso desde etapas juveniles [118]. En estudios previos la evaluación de la hipersecreción de CAs se ha hecho: i) evaluando la exocitosis de CAs como respuesta a un solo estímulo despolarizante; y, ii) inhibiendo de manera irreversible la dinámica de Ca^{2+} asociada al RE empleando cocteles altamente tóxicos compuestos por cafeína, rianodina y tapsigargina que dejan fuera de combate al organelo, sin la posibilidad de recuperarse. No obstante, en un contexto fisiológico, las CCs de la médula adrenal no están sometidas a estímulos únicos, por el contrario, reciben numerosas entradas despolarizantes que conducen a su activación y liberación de gránulos. Además, una condición necesaria para que una CC pueda responder a numerosos estímulos despolarizantes es que el RE conserve la capacidad de captar y liberar Ca^{2+} de manera dinámica ante la llegada de todos ellos. En este trabajo se pretende ir más allá y explorar la necesidad de cambiar el diseño experimental en lo que se refiere al régimen de estimulación, así: i) estímulos despolarizantes repetitivos con solución de alto K^+ ; y, ii) inhibición reversible de la captación de Ca^{2+} del RE mediante CPA. Esta estrategia permitió

observar las respuestas secretoras y los movimientos de $[Ca^{2+}]_i$ en CCs de ratas SHR y WKY ante despolarizaciones sucesivas, mientras se observaba el efecto de la aplicación de CPA para evaluar la contribución del RE a los dos procesos. El estudio detallado de los mecanismos que determinan la secreción de CAs en las CCs de ratas SHR ofrece un recurso valioso para el estudio de la patogénesis y la fisiopatología de la HTA esencial con resultados que podrían ser extrapolables a la condición humana.

Una segunda dimensión que justifica buena parte de esta investigación está relacionada con el uso de las células cromafines como modelos de secreción hormonal y neuronal. Las CCs poseen una maquinaria de manejo de $[Ca^{2+}]_i$ y de exocitosis de CAs que por selección natural se ha conservado entre células secretoras y entre especies, por lo que — esencialmente— comparten con neuronas mecanismos similares de liberación con tan solo unas pocas diferencias [138] [55]. El estudio de la exocitosis estimulada de neurotransmisores y sus determinantes moleculares en neuronas; que son células de difícil acceso, mantenimiento y con morfologías complejas para estudios funcionales; puede ser examinado en CCs, que son células robustas en cultivo, se obtienen en grandes cantidades, presentan características morfológicas que facilitan su estudio electrofisiológico y, además, su mantenimiento es relativamente económico.

V. Objetivos

General

Caracterizar la participación del retículo endoplásmico en la dinámica del Ca^{2+} intracelular y la exocitosis de catecolaminas en células cromafines aisladas de ratas normotensas (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR).

Específicos

1. Caracterizar los cambios en la cinética de las señales Ca^{2+} intracelular y la velocidad secreción de catecolaminas a estímulos repetitivos en células cromafines de ratas WKY y SHR.
2. Determinar si la ganancia del mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) del retículo endoplásmico difiere entre las células cromafines de ratas WKY y SHR.
3. Estudiar si el retículo endoplásmico de las células cromafines de rata se comporta mayoritariamente como una fuente o un sumidero de Ca^{2+} .
4. Caracterizar la dinámica de Ca^{2+} intracelular y su vinculación con la cinética de la exocitosis de catecolaminas de manera simultánea en células cromafines individuales de rata.

VI. Hipótesis

Con base a la información publicada por nuestro laboratorio suponemos que la inhibición reversible de la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (SERCA) por ácido ciclopiazónico (CPA) *disminuirá* las señales de Ca^{2+} intracelular y la exocitosis estimulada de catecolaminas en las células cromafines de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), como ocurre en las células cromafines de bovino; y *facilitará* la liberación estimulada de catecolaminas y los transitorios de Ca^{2+} intracelular en células cromafines de ratas normotensas (WKY), como se observa en las células cromafines de ratón.

VII. Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron machos de rata Wistar Kyoto (WKY) normotensa y espontáneamente hipertensa (SHR) (*Rattus norvegicus*) de 13 a 16 semanas de edad. Los animales fueron comprados originalmente en los laboratorios Charles River (Wilmington, USA) y se han estado reproduciendo de manera controlada durante dos años en la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Las ratas fueron mantenidas en un ambiente con temperatura controlada de 22 °C y con un ciclo de 12 h luz/oscuridad. Los animales recibieron comida estándar para rata y agua *ad libitum* durante su tiempo de vida. Todos los procedimientos experimentales realizados a los animales se hicieron siguiendo la Guía Mexicana para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Secretaría de Agricultura (SAGA—RPA NOM-062-Z00—1999) con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-IFC: protocolo # AHC24-141).

Por su parte, las glándulas adrenales de vaca (*Bos taurus*) se obtuvieron del rastro La Paz en la zona metropolitana de la Ciudad de México. Alrededor de 5-6 glándulas aisladas de diferentes especímenes fueron sumergidas en PBS frío y transportadas al laboratorio pocas horas después de su disección.

Preparación de cultivo primario de células cromafines adrenales de rata y bovino

Las ratas SHR y WKY fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina y xilazina (80 mg/kg — 10 mg/kg) y luego sacrificadas por decapitación. Se extrajeron las glándulas adrenales, se limpió el tejido graso que las envuelve y luego se sumergieron en una solución fría de Krebs-bicarbonato (KB) gaseada continuamente con una mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5%. La solución KB tenía la siguiente composición (en milimolar): 125 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄ y 10 glucosa. Por su parte, las glándulas adrenales de bovino fueron obtenidas de un rastro en el Estado de México y transportadas al laboratorio en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría.

Las CCs de rata se obtuvieron como está descrito en [107]. Brevemente, se removió con pinzas el tejido capsular evitando desgarrar las glándulas y luego, empleando tijeras

adecuadas, se retiraron las cortezas adrenales haciendo cortes bajo el microscopio estereoscópico hasta despejar las médulas, que lucen color beige a la luz. Las médulas adrenales así aisladas fueron luego digeridas enzimáticamente en un coctel de colagenasa tipo 1 (1.5 mg/mL) y DNasa tipo 1 (1 mg/mL) en solución Hanks sin Ca²⁺/Mg²⁺ a pH 7.4 durante 30-40 minutos a 37 °C en reposo. Este tratamiento produce una suspensión de conglomerados celulares. Para disociar completamente la médula, la suspensión se agitó cuidadosamente por inversión cada 10 minutos durante la digestión y se pasó a través de una pipeta Pasteur de vidrio de diámetro en su punta cada vez más pequeño para deshacer mecánicamente los conglomerados y así obtener una suspensión de CCs disociadas. Al cabo del proceso digestivo, la suspensión de células se centrifugó a 1000 rpm y el precipitado con las CCs se resuspendió en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 5 µg/mL de insulina y 1X de antibiótico y antimicótico. Aproximadamente, 2x10⁴ células se sembraron en laminillas circulares de vidrio (18 mm de diámetro) cubiertas previamente con poli-l-lisina 0.01% y se dejaron en la incubadora en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO₂ hasta su uso, 24-48 h después y por no más de 5 días. El medio DMEM se cambió 24 h después del aislamiento y luego cada dos días.

Por su parte, las médulas adrenales bovinas fueron disectadas, limpiadas de grasa, cortadas y sumergidas en solución Hanks sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ a pH 7.4 con colagenasa tipo 1 (2 mg/mL) y DNasa tipo 1 (1.5 mg/mL) durante 30-40 minutos a 37°C. Los fragmentos celulares resultantes fueron disociados mediante agitación manual suave y la suspensión de CCs se centrifugó a 1000 rpm para precipitarlas. El precipitado de CCs de bovino (CCBs) se resuspendió entonces en medio DMEM suplementado con 10% SFB, 5 µg/mL de insulina y 1X de antibiótico y antimicótico. Aproximadamente 2x10⁴ CCBs fueron sembradas en portaobjetos de vidrio e incubadas en condiciones idénticas a las CCs de rata.

Registro de la exocitosis de CAs de CCs adrenales de rata y bovino mediante amperometría manual de célula única

Las laminillas de vidrio con 2x10⁴ CCs de rata o bovino fueron aseguradas en una cámara de registro y puestas en la platina de un microscopio de luz invertido (Leica DM14000B) para el registro de la secreción de CAs. La cámara de registro con las células se perfundió continuamente durante todo el experimento con solución Tyrode (2 mL/min) impulsada por gravedad cuya composición (en mM) es: 137 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa y ajustada a pH 7.4 con NaOH y 310 mOsm con sacarosa. La exocitosis de CAs se midió por medio de amperometría de célula única [108] y los microelectrodos de fibra de carbono

requeridos para ello fueron elaborados como se describe detalladamente en [107]. Brevemente, se aislaron fibras de carbono de 10 μm de diámetro y se cortaron a una longitud de 15 mm bajo el estereoscopio. Las fibras se introdujeron a través del extremo estrecho de una punta de plástico para micropipetas de 20 μL (Cat. T—400—L, Axygen), se aplicó calor con una resistencia circular alrededor del plástico hasta que comenzó a fundirse y, entonces, se estiró hasta que el cilindro plástico abrasando firmemente la fibra de carbono alcanzó dimensiones celulares. Para exponer la fibra de carbono se cortó transversalmente con una cuchilla el extremo estrecho del cilindro plástico (con la fibra en su interior) y se le aplicó un pulso de calor para retraer el plástico y así exponer la fibra de carbono con la que se contacta a las CCs durante los registros. Finalmente, los microelectrodos se conectaron al cabezal del amplificador por medio de una solución de KCl 3 M y, antes de los registros en CCs, se calibraron exponiéndolos a una solución de EPI 50 μM diluida en solución Tyrode mientras eran mantenidos a un voltaje de +700 mV. Solo los electrodos que produjeron una corriente de oxidación >200 pA tras el contacto con EPI 50 μM se emplearon para registrar la liberación de CAs en CCs.

La exocitosis de CAs en tiempo real de CCs de rata y bovino se realizó a 22—24°C tocando suavemente la membrana celular con la fibra de carbono fijada a un potencial de +700 mV contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl embebido en la solución Tyrode del baño (figura 12). Así, los registros se realizaron en la modalidad de fijación de voltaje con un amplificador EPC-10 operado por el software PatchMaster (HEKA) y las corrientes amperométricas resultantes de la exocitosis de CAs fueron adquiridas muestreando la señal análoga original a 4 kHz y filtrándolas con un pasa-bajos a 400 Hz. Bajo estas condiciones de registro se les aplicó el protocolo de estimulación a las CCs para evaluar la participación del RE en la secreción de CAs.

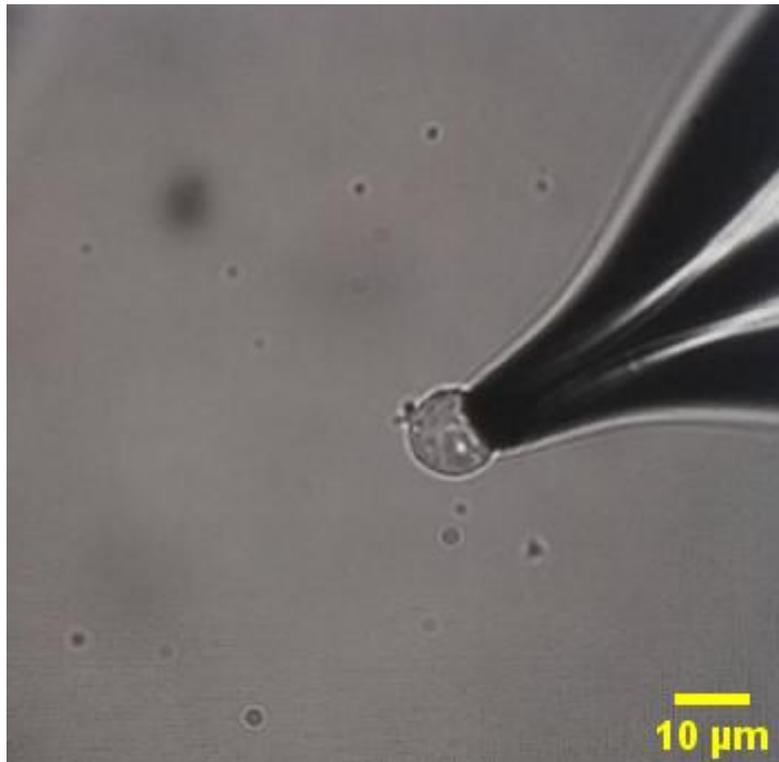


Figura 12. Célula cromafín individual bajo registro amperométrico. Para medir la exocitosis de CAs se empleó amperometría manual de célula única. En esta técnica se emplean microelectrodos de fibra de carbono ($10\ \mu\text{m}\ \Theta$) aislados eléctricamente con plástico, fabricados manualmente en el laboratorio. Durante el registro, la fibra de carbono expuesta del electrodo, fijada a $+700\ \text{mV}$ por un amplificador de patch-clamp, se pone en contacto suave con la membrana plasmática de la CC que se va a registrar. Luego de estabilizar el registro durante 1 min, la CC es activada con el protocolo de estimulación deseado. Foto archivo personal.

El protocolo de estimulación de las CCs de rata y bovino se resume en (figura 13). Para estimular a las células se utilizó una pipeta de perfusión de salida común (10 mm largo, 1 mm diámetro interno, 3 μL volumen muerto), ubicada a 200-300 μm sobre la célula bajo registro, alimentada por 4 líneas de perfusión con diferentes soluciones: i. solución Tyrode; ii. solución estimulante de alto K^+ ; iii. solución Tyrode con ácido ciclopiazónico (CPA) 10 μM ; iv. solución Tyrode con rianodina (Ry) 10 μM . La composición de la solución de alto K^+ (en mM): NaCl 78, KCl 60, CaCl_2 2, HEPES 10, pH 7.4. La salida de cada solución se controlaba por válvulas electrónicas operadas por un software Omnivalv (México). Las células se estimularon con 8 pulsos repetitivos (1-8) de solución de alto K^+ de 1 s de duración cada 30 s. Para evaluar el efecto de bloquear la respuesta del RE al $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se aplicó brevemente CPA (10 μM) o Ry (10 μM) entre los pulsos 3 a 5. Inmediatamente después de cada pulso de alto K^+ se aplicó solución Tyrode para lavar la nube de iones y moléculas alrededor de las células. Sobre la laminilla de vidrio, las CCs se registraron de izquierda a derecha mientras la solución Tyrode del baño corría de derecha a izquierda, de manera que las células seleccionadas para cada nuevo registro no habían tenido contacto con las soluciones usadas con la célula previamente registrada. Un

minuto después de correr el protocolo de estimulación, a cada CC se le aplicó un pulso de alto K^+ para verificar que la célula respondía y era viable.

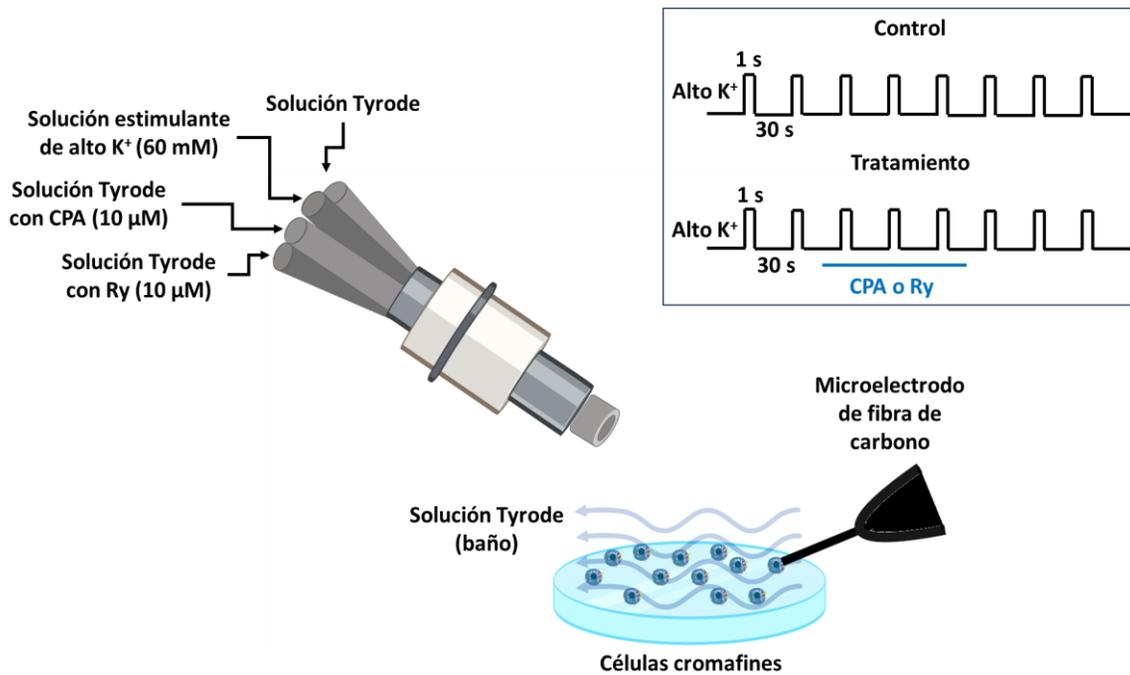


Figura 13. Sistema de perfusión y estimulación de las células cromafines. Para perfundir a las CCs con diferentes soluciones se empleó una pipeta de peri—perfusión con salida única alimentada por 4 entradas: solución Tyrode, solución de alto K^+ , CPA ($10 \mu M$) y Ry ($10 \mu M$). En el recuadro se muestra el esquema del protocolo de estimulación en condiciones control y de tratamiento empleado para el registro de espigas amperométricas y de señales de $[Ca^{2+}]_i$. En ambos casos se dieron 8 pulsos de alto K^+ de 1 s en duración a intervalos de 30 s y, en los experimentos diseñados para evaluar la contribución del RE, se liberó CPA o Ry entre los pulsos despolarizantes 3ro y 5to. Ilustración generada en Biorender por Angélica Martínez B.

Con este experimento se evaluó el efecto de interrumpir de manera transitoria la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE en las CCs sobre parámetros cinéticos de la exocitosis de CAs como el número de espigas y la carga amperométrica acumulada.

Registro en tiempo real de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en CCs adrenales de rata y bovino mediante microscopía de fluorescencia

Las laminillas de vidrio con 2×10^4 CCs de rata o bovino fueron incubadas con $2 \mu M$ del indicador fluorescente de $[Ca^{2+}]_i$ Fluo—4 AM disuelto en solución Tyrode durante 30-40 minutos a $24 \text{ }^\circ C$. Luego se lavaron las células sobre el vidrio y se ajustaron en el fondo de una

cámara de registro acoplada a un microscopio invertido (Leica DM14000B). La cámara de registro con las células se perfundió constantemente durante todo el experimento con solución Tyrode (2 mL/min) impulsada por gravedad. Para iluminar a las células se empleó una lámpara Leica (EL6000) a la cual se ajustaron fibras ópticas para dirigir la luz hacia el microscopio. Ya en su interior, la luz pasó a través de un cubo de fluorescencia con un filtro pasa-banda (480/40 nm) antes de excitar la muestra y, luego, la luz emitida desde la muestra pasó a través de otro filtro pasa-banda (528/30 nm) ubicado en el camino de la luz antes de su reflexión en el puerto CCD de una cámara digital refrigerada (Andor iXon897). Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas a 60 ms de exposición cada 380 ms empleando un lente de 40X. Tanto la iluminación de la muestra como la adquisición de las imágenes se programaron empleando el software Micro-Manager versión 1.4 [109]. Antes de comenzar los registros de fluorescencia las CCs se registraron durante 5 min sin estimulación. Posteriormente, las células se despolarizaron consecutivamente mediante la aplicación de 8 pulsos de solución de alto K^+ de 1 s de duración a intervalos de 30 s con el mismo sistema de perfusión mostrado en la (figura 13). Cuando fue necesario, se aplicó CPA (10 μM) o Ry (10 μM) entre los pulsos 3 a 5 para evaluar la contribución del RE a la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$.

La secuencia de imágenes de fluorescencia (películas) fueron guardadas en formato multi-tiff, procesadas y analizadas empleando el software Image J. Las películas de fluorescencia cruda fueron transformadas en películas de cambio de fluorescencia (ΔF), parámetro que se calculó como $\Delta F = F(i) - F(0)$, donde $F(i)$ corresponde a la fluorescencia de cada imagen de la secuencia en la película y $F(0)$ resulta de promediar la fluorescencia de las 5 primeras imágenes de la secuencia. A las CCs que respondieron a la despolarización con alto K^+ con un ΔF mayor a una desviación estándar $DE \pm 0.5$ se les dibujó el contorno empleando la herramienta ROI (region of interest) de Image J y sobre estas se cuantificó el ΔF en el tiempo a nivel de célula única. Con los valores calculados de ΔF se obtuvieron gráficas de ΔF vs t para cada célula en los que se observaron los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ ($t - [Ca^{2+}]_i$) inducidos por despolarización con alto K^+ .

En este experimento se evaluó el efecto de bloquear transitoriamente la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE sobre el ancho temporal a la mitad (HW) y el área normalizada (NA) bajo la curva de los $t - [Ca^{2+}]_i$ inducidos por despolarización con alto K^+ .

Registro simultáneo de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs en CCs adrenales de rata individuales

En algunos experimentos se evaluó de manera simultánea, en la misma célula, la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ y la liberación de CAs en respuesta a la despolarización con alto K^+ en las CCs adrenales de rata. Para ello, las 2×10^4 CCs en las laminillas de vidrio fueron incubadas con $2 \mu M$ Fluo-4 AM durante 30-40 min a $24^\circ C$, se ajustaron en la cámara de registro después de lavar el exceso de indicador, se pusieron en la platina del microscopio invertido y se configuró la perfusión a 2 mL/min de solución Tyrode para bañar y mantener a las células estables durante los registros. También se posicionó la pipeta de peri-perfusión sobre la célula para estimularla. Luego, conectado al equipo de *patch-clamp* con un potencial eléctrico fijado en $+700$ mV, se ubicó un microelectrodo de fibra de carbono en estrecho contacto con la membrana plasmática de la CC elegida. En ese momento, se activó el programa de adquisición de imágenes de fluorescencia (Micro-Manager) y el programa de registro de las señales amperométricas (Patchmaster) para adquirir ambos datos simultáneamente. Luego de 1 minuto de registro, la CC se estimuló con 8 pulsos consecutivos de solución con alto K^+ de 1 s de duración cada 30 s y, entre el 3er y 5to pulso, se expuso la célula a CPA para bloquear transitoriamente la captación de $[Ca^{2+}]_i$ del RE, como se describió previamente. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($22-24^\circ C$).

Análisis de datos y estadística

El análisis de espigas amperométricas se hizo empleando el paquete Macro escrito por el Dr. Ricardo Borges [110] para IgorPro, que permite la detección y el análisis de eventos únicos de liberación por exocitosis. Con este análisis se obtuvieron dos parámetros cruciales para poder comparar: la carga acumulada y el número de espigas. Respecto a la carga acumulada se calculó la integral de la corriente de oxidación de cada espiga amperométrica, luego se sumó la carga acumulada de todas las espigas por un tiempo determinado después de un estímulo despolarizante con alto K^+ y el resultado se tomó como secreción total por estímulo. El número de espigas corresponde a los eventos únicos de exocitosis después de un estímulo y con ello se obtuvo un estimado del número de gránulos liberados por estímulo. Para finalizar el análisis amperométrico, se realizó también una evaluación de la cinética de la exocitosis de CAs. Para ello se escribió un código en MATLAB® (R2021a) que suma la carga acumulada cada 0.5 s después de un determinado estímulo y el resultado se graficó a lo largo del tiempo total de respuesta al estímulo (30 s).

En referencia al análisis de los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ inducidos por despolarización con alto K^+ se calcularon dos parámetros para hacer comparaciones: el ancho al 50% de la carga del $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ (HW) y el área normalizada bajo la curva del $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ (NA). Para el cálculo de ambos parámetros se empleó el programa Origin 6.0. Finalmente, se calculó la primera derivada de $\Delta F(t)$ empleando el comando *diff X(t)* en MATLAB® que computa las diferencias entre valores adyacentes de X (ΔF) a lo largo del tiempo t [$Y = X(2)-X(1) + X(3)-X(2) \dots X(m)-X(m-1)$] y que devuelve la función $Y = \text{diff } X(t)$ con todos los datos de las diferencias en X. Los valores de Y se graficaron en función del tiempo.

La media, el intervalo de confianza y el error estándar de la media (SEM) derivados del número de gránulos liberados y la secreción total por cada estímulo de todas las células de cada cepa de rata (SHR y WKY) fueron agrupadas para el análisis estadístico y las pruebas de hipótesis correspondientes. De la misma manera se procedió con el HW y la NA de los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ inducidos por despolarización con alto K^+ . Antes de hacer las pruebas de hipótesis estadística se verificó la normalidad o no de los datos mediante la prueba Shapiro—Wilk para decidir qué estadístico paramétrico/no paramétrico usar. En los casos en los que se corroboró normalidad estadística se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para poner a prueba las hipótesis correspondientes. Por su parte, cuando no se distribuían de manera normal, los datos fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney.

VIII. Resultados

Entre las posibles causas de una liberación exacerbada de Ca^{2+} por el retículo endoplásmico (RE) en células cromafines (CCs) de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) que, en parte, explican su fenotipo hipersecretor de catecolaminas (CAs) [104], se encuentran: i. mayor concentración de Ca^{2+} en el RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$); ii. mayor número de receptores de rianodina (RyRs) en el RE; iii. mayor afinidad de los RyR por Ca^{2+} . Para entender el papel de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en la aparición del fenotipo hipersecretor en las CCs, se plantea determinar si el RE se comporta como una *fente* de Ca^{2+} que facilita la exocitosis estimulada de CAs o si, por el contrario, se comporta como un *sumidero* de Ca^{2+} que deprime la respuesta secretora tras el estímulo despolarizante. Para ello, se planteó reducir parcialmente la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ inhibiendo de forma reversible con CPA la captación de Ca^{2+} del organelo y se estudió el efecto que esta intervención farmacológica tiene sobre las señales amperométricas de exocitosis de CAs y los transitorios de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) inducidos por despolarización en las CCs de ratas Wistar Kyoto normotensas (WKY) y espontáneamente hipertensas (SHR). Las CCs fueron estimuladas mediante un protocolo de estimulación repetitiva que consistió en la aplicación de 8 pulsos de alto K^+ de 1 s en duración a intervalos de 30 s. En las ocasiones en que se examinó la contribución del RE a los procesos de liberación de CAs y dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se aplicó CPA (o rianodina, Ry) entre los pulsos despolarizantes 3ro y 5to mientras se continuaba estimulando a las células (véase la figura 13).

Efecto de una despolarización repetitiva sobre la exocitosis de CAs de CCs de ratas hipertensas SHR y normotensas WKY

De manera inicial se evaluó si la contribución del RE a la exocitosis de CAs difiere entre CCs de ratas WKY y ratas SHR. Dado que la actividad del RE se estudiará mediante la aplicación de un fármaco de acción reversible (CPA) mientras las células son estimuladas con 8 pulsos despolarizantes sucesivos (figura 13), es necesario determinar la respuesta secretora normal de las CCs ante el flujo repetitivo de entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática en condiciones normales. Para ello, se estimularon las células con 8 pulsos de alto K^+ (60 mM, 1 s) a intervalos de 30 s. Aunque existen diferentes sustancias secretagogas, se prefirió el uso de despolarización con alto K^+ en lugar de acetilcolina (ACh) para evitar las complicaciones que surgen de la activación de los receptores de ACh nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs), junto con la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaVs). Adicionalmente, los nAChRs se desensibilizan al estimularlos de manera repetitiva con el

agonista [111] [112]. Cada pulso de alto K^+ cambia únicamente el voltaje de la membrana (V_m) produciendo una despolarización que estimula la apertura de los CaVs, lo cual permite la entrada de Ca^{2+} en la célula y la consecuente elevación de su concentración en el citosol para la formación de microdominios de alto Ca^{2+} (HCMD) necesarios para iniciar la exocitosis [113].

En la figura 14A y B se muestran registros amperométricos representativos de la exocitosis de CAs de CCs de ratas WKY y SHR estimuladas con 8 pulsos consecutivos de alto K^+ en condición control (sin intervención farmacológica). Como se ha reportado previamente, tras un estímulo las CCs de ratas SHR producen más eventos de exocitosis que su contraparte WKY debido, por una parte, a una mayor contribución del mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) [104] [114], y por otra, a la existencia de un *pool* de gránulos cromafines (GCs) listo para liberar (PLL) más grande. También se observan marcadas diferencias en la cinética de la exocitosis de CAs entre las CCs de ambas cepas de ratas (figura 14C y D). El número medio de espigas, que refleja la cantidad de eventos únicos de exocitosis, es aproximadamente el doble en CCs de ratas SHR que en WKY (p -valor < 0.01) como respuesta al primer estímulo. Así mismo, ante el primer estímulo, la carga acumulada en el tiempo, es decir, la cantidad de CA liberada es casi el triple en CCs de ratas SHR al compararla con las CCs de ratas WKY (p -valor < 0.01) (figura 14C y D, Tabla 2). Notablemente, la respuesta amperométrica después del primer estímulo decae abruptamente en las CCs de ambas cepas de rata (figura 14A y B). Así, tanto el número medio de espigas como la carga acumulada entre el primer y segundo estímulo disminuyó un 35% (p -valor < 0.05) y un 45% (p -valor < 0.05) respectivamente en CCs de ratas WKY; mientras que en CCs de ratas SHR la caída en el número de espigas y la carga acumulada fue de 55% (p -valor < 0.01) y 64% (p -valor < 0.001), respectivamente (figura 14C y D). Ya para el 8vo estímulo tanto el número medio de espigas como la carga acumulada por estímulo se redujo un 71% y 78% en CCs de ratas WKY y 86% y 92% en CCs de ratas SHR, respectivamente (figura 14C y D).

Tabla 2. Decaimiento de la exocitosis de catecolaminas en células cromafines de ratas WKY y SHR durante la estimulación repetitiva. Se muestran los resultados numéricos porcentuales de la secreción de CAs remanente generada por despolarización de CCs no tratadas como respuesta a los estímulos 2do a 8vo respecto a la respuesta al 1er estímulo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Control		Porcentaje de exocitosis registrada comparada con la obtenida con el 1er estímulo						
		P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Número de espigas por estímulo	WKY	64.6 ± 7.4	51.6 ± 10.9	45.6 ± 6.3	42.8 ± 16.7	30.7 ± 12.8	25.4 ± 8.5	28.9 ± 5.0
	SHR	44.3 ± 7.8	34.1 ± 9.1	25.5 ± 5.7	20.5 ± 4.4	19.4 ± 5.1	16.6 ± 4.2	14.0 ± 4.2
Carga acumulada	WKY	55.0 ± 9.5	47.4 ± 8.4	40.1 ± 11.1	37.5 ± 16.7	27.1 ± 9.3	17.4 ± 5.5	21.8 ± 5.4
	SHR	35.4 ± 7.6	26.9 ± 8.2	18.9 ± 6.6	12.5 ± 4.3	11.6 ± 4.4	10.3 ± 4.1	7.8 ± 3.1

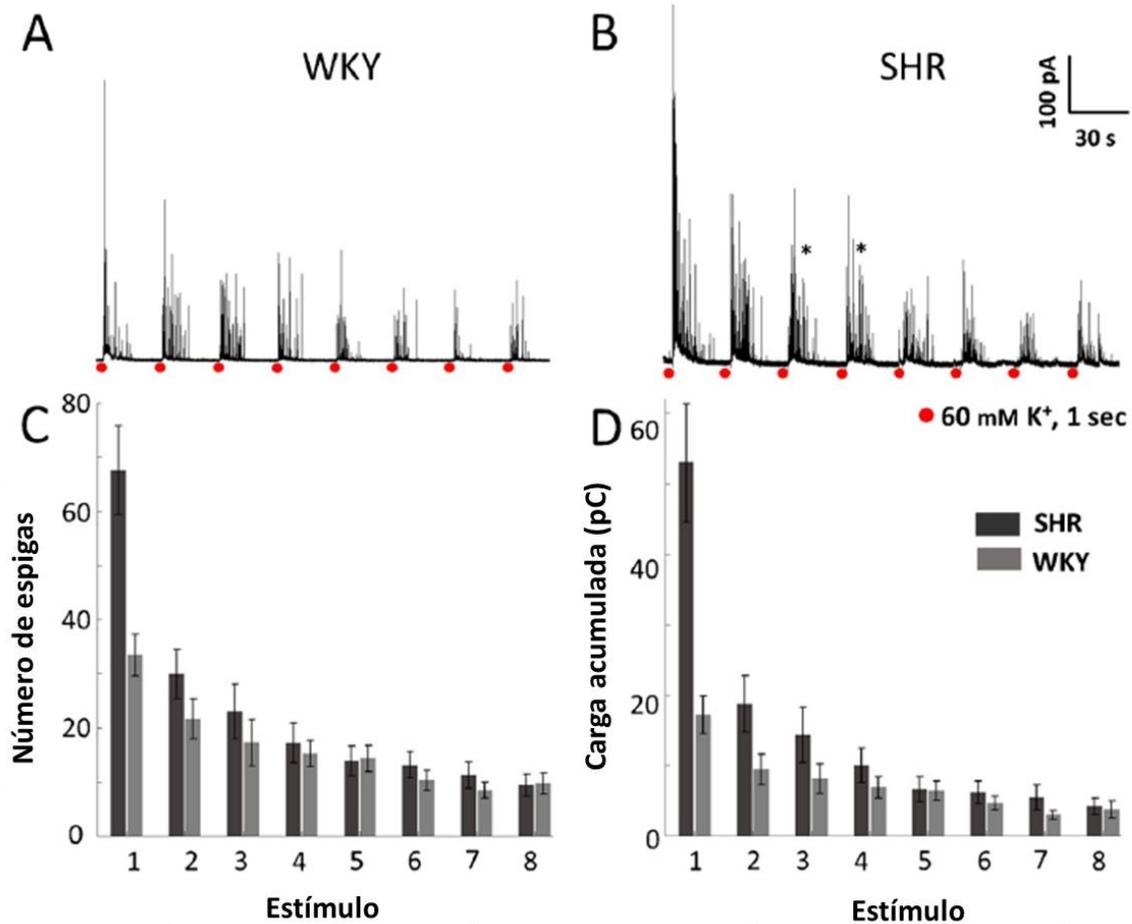


Figura 14. Registros amperométricos de exocitosis de catecolaminas activada por despolarización en células cromafines de ratas WKY y SHR no tratadas. Las CCs de ratas WKY y SHR fueron estimuladas con 8 pulsos de alto K^+ de 1 s en duración a intervalos 30 s. **A.** Registro amperométrico representativo en una CC de rata WKY y **B.** SHR bajo condiciones control en respuesta a estímulos despolarizantes. El número de espigas **C** y la carga acumulada **D** fueron cuantificados a partir del registro amperométrico de 14 CCs de ratas WKY (barras grises) y 14 CCs de ratas SHR (barras negras). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los asteriscos señalan registros que muestran dos ráfagas de espigas amperométricas.

¿Cómo afecta a la exocitosis de CAs de CCs de ratas WKY y SHR la aplicación de CPA?

Resultados previos han demostrado que la exocitosis de CAs tras un estímulo despolarizante en CCs de ratas SHR es significativamente mayor que en CCs de ratas WKY y que una mayor liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares por el mecanismo de CICR es responsable de este fenotipo hipersecretor [104]. Una hipótesis razonable que explicaría la liberación exacerbada de Ca^{2+} por el RE es que la $[Ca^{2+}]_{RE}$ de CCs en ratas SHR ($[Ca^{2+}]_{RE} - SHR$) sea mucho mayor que la $[Ca^{2+}]_{RE}$ de CCs en ratas WKY ($[Ca^{2+}]_{RE} - WKY$), lo que haría que en una

misma unidad de tiempo hubiera más liberación Ca^{2+} hacia el citosol en las CCs de ratas hipertensas que en las normotensas tras la apertura de los RyRs; y dejando así entrever que el RE se comporta de manera global como una *fuentes* de Ca^{2+} que *facilita* la exocitosis o como un *sumidero* de Ca^{2+} que la *deprime*, respectivamente. Una manera de evaluar si la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ está implicada en la aparición del fenotipo hipersecretor es vaciar de Ca^{2+} parcialmente el RE (inhibiendo su captación y, consecuentemente, su liberación por el mecanismo de CICR) y medir el efecto que esta maniobra tiene sobre la exocitosis de CAs ante una despolarización que dé apertura a los CaVs. Así, si el RE se comporta normalmente como una *fuentes* de Ca^{2+} (es decir, tiene una alta $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$), entonces bloquear la captación (y liberación) del ión llevaría a una *depresión* de la exocitosis; al contrario, si se comporta originalmente como un *sumidero* de Ca^{2+} (baja $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$), entonces su bloqueo llevaría a una *facilitación* de la secreción por el aumento en la disponibilidad de Ca^{2+} no captado en el citosol [91].

Se especuló inicialmente que si la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}\text{—SHR} \gg \gg [\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}\text{—WKY}$ entonces la inhibición transitoria de la captación (y liberación) de Ca^{2+} del RE por CPA tendría un efecto *supresor* sobre la respuesta amperométrica de CCs de ratas SHR, pero un efecto *facilitador* en su contraparte WKY. Para evaluar esta hipótesis, las CCs de ambas cepas de rata —bajo registro amperométrico— fueron bañadas en solución Tyrode mientras se les aplicaron los estímulos 1ro y 2do; luego se aplicó CPA (10 μM) durante 90 s mientras se les aplicaban los estímulos 3ro, 4to y 5to; y, finalmente, se lavó el CPA para luego liberar los estímulos 7mo y 8vo. Se observa que el CPA abolió casi por completo la producción de espigas amperométricas en las CCs de ratas WKY y SHR en respuesta a estímulos despolarizantes (figura 15A y B). El efecto del CPA comienza rápidamente y perdura mientras está presente durante los estímulos 3ro a 5to. Cuando se retira, se observa una recuperación rápida pero parcial de las respuestas amperométricas (figura 15A, B, C, D; estímulos 6to a 8vo). El efecto cuantitativo de la aplicación y el lavado de CPA sobre el número medio de espigas y la carga acumulada se resumen en la figura 15C, D; y la Tabla 3. Cuando se compara la respuesta amperométrica al estímulo #3 respecto al estímulo #2 después de aplicar CPA, se observa que el porcentaje de inhibición del número medio de espigas y la carga acumulada por estímulo se reduce un 94% (p —valor < 0.001) y un 96% (p —valor < 0.001), respectivamente, en CCs de ratas WKY. Por su parte, en CCs de ratas SHR el porcentaje de inhibición del número medio de espigas fue de 83% (p —valor < 0.01) mientras que el de la carga acumulada fue de 90% (p —valor < 0.001). La recuperación parcial de la respuesta amperométrica después de lavar el CPA posiblemente se deba, en parte, al decaimiento normal de la exocitosis debido a la estimulación repetitiva (figura 14A, B).

El hecho de que la interrupción transitoria de la captación (y liberación) de Ca^{2+} del RE por CPA disminuya la exocitosis estimulada de CAs sugiere que en condiciones normales de

estimulación (sin intervención farmacológica) el RE de las CCs de rata, independientemente de la cepa, se comporta como una *fuentes* de Ca^{2+} que *facilita* la secreción de CAs tras la entrada de Ca^{2+} a la célula. Naturalmente, este resultado implica también que la $[Ca^{2+}]_{RE}$ —SHR es similar a la $[Ca^{2+}]_{RE}$ —WKY, al menos cuando se evalúan sus consecuencias sobre la secreción de CAs. Se verá más adelante que al evaluar el efecto del CPA sobre los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ se obtienen diferencias que sugieren que $[Ca^{2+}]_{RE}$ —SHR > $[Ca^{2+}]_{RE}$ —WKY.

Tabla 3. Inhibición de la exocitosis estimulada de catecolaminas por CPA en células cromafines de ratas WKY y SHR. El porcentaje de secreción remanente de CAs durante la aplicación de CPA (estímulos P3, P4 y P5) es comparado con el porcentaje de exocitosis tras el lavado del CPA (estímulos P6 a P8). $n = 27$ CCs de 6 ratas WKY; $n = 27$ CCs de 6 ratas SHR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; calculado respecto al promedio de P3 a P5.

Efecto del CPA		Porcentaje de exocitosis comparada con la del 2do estímulo					
		CPA			Lavado		
		P3	P4	P5	P6	P7	P8
Número de espigas por estímulo	WKY	5.6 ± 2.6	8.5 ± 7.5	8.2 ± 6.9	9.7 ± 16.2	51.9 ± 16.4*	47.8 ± 15.1 *
	SHR	17.1 ± 3.0	21.5 ± 3.4	21.5 ± 3.6	38.9 ± 9.8 *	65.4 ± 15.6 *	45.3 ± 9.0 *
Carga acumulada	WKY	3.4 ± 4.3	5.6 ± 7.7	6.2 ± 5.1	6.6 ± 21.6	31.0 ± 19.0 *	45.0 ± 16.7 *
	SHR	10.7 ± 2.9	15.6 ± 2.5	15.5 ± 3.6	18.9 ± 12.0	51.5 ± 14.4 *	43.3 ± 12.0 *

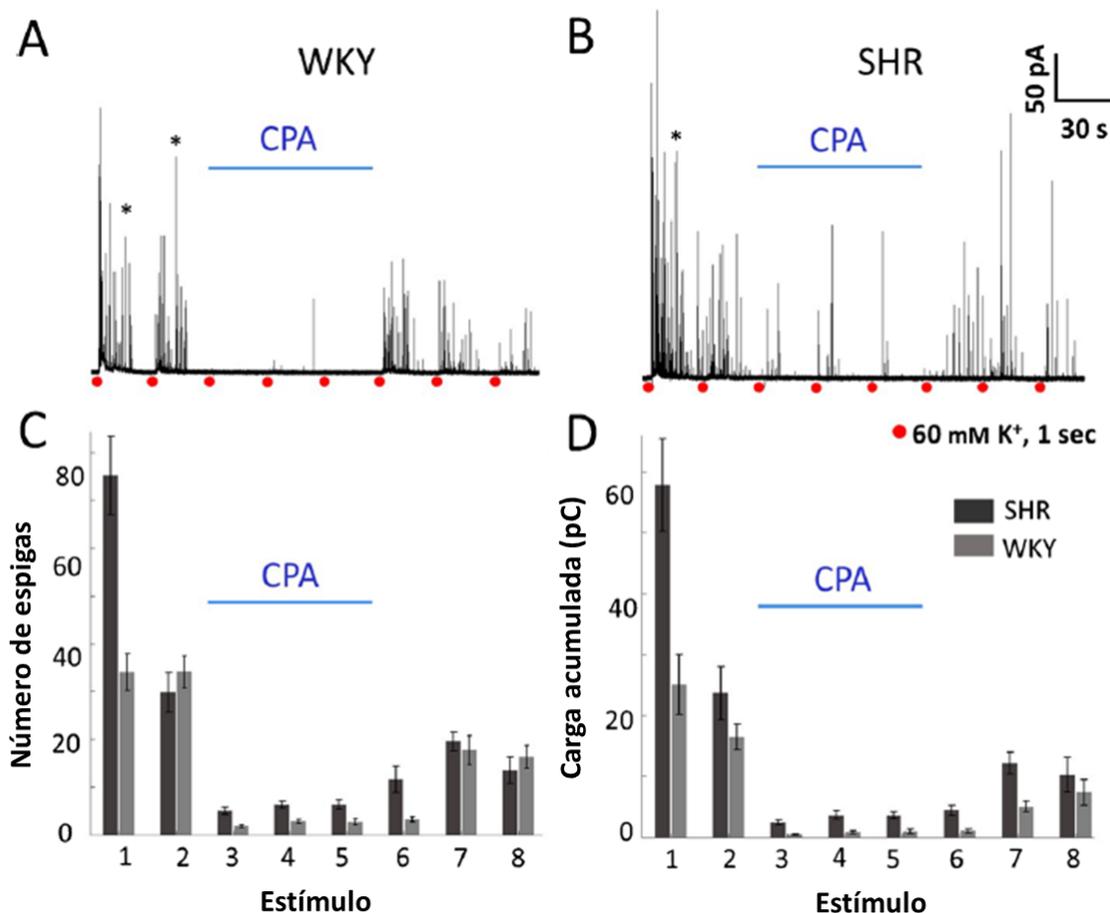


Figura 15. Efecto del CPA sobre la exocitosis recurrente de catecolaminas en células cromafines de ratas WKY y SHR. En A y B se muestran registros amperométricos representativos de una CC de rata WKY y SHR, respectivamente. Los estímulos 1ro y 2do se dieron en condiciones control mientras las células eran bañadas en solución Tyrode normal. Luego se aplicó solución Tyrode con CPA durante 90 s mientras se dieron los estímulos 3ro, 4to y 5to. Finalmente, se lavó el CPA y se liberaron los estímulos 6to a 8vo en presencia de solución Tyrode normal nuevamente. C. El número de espigas amperométricas y D. la carga acumulada por estímulo fue cuantificada en CCs de ratas WKY (barras grises) y CCs de ratas SHR (barras negras) a lo largo de todo el experimento. $n = 27$ CCs de ratas WKY; $n = 27$ CCs de ratas SHR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los asteriscos indican descargas con dos ráfagas de espigas amperométricas.

¿El CPA afecta la exocitosis de CCs de rata de la misma manera que la exocitosis de las CCs de ratón o de las CCs de bovino?

Con base en los datos previos del laboratorio [104] [114], inicialmente se especuló que en CCs de ratas SHR, donde la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares es robusta, la exocitosis de CAs debería ser inhibida significativamente por el CPA. Contrariamente, en CCs de ratas WKY, donde la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares es más débil, la

secreción de CAs debería ser menos inhibida por el CPA. De los resultados que se ilustran en la figura 15 se observa que, contrariamente a nuestra suposición, el CPA bloquea la exocitosis de CAs en las CCs de manera semejante, independientemente de la cepa de rata.

Históricamente, el papel del RE en la exocitosis de CAs ha sido ampliamente estudiado en CCs de bovino y de ratón. No obstante, se conoce comparativamente poco sobre la contribución de este organelo a la secreción de CAs en las CCs de rata. Es por esto que, más allá de definir si existe una respuesta diferencial del RE sobre la liberación de CAs de CCs entre ratas WKY y SHR, una pregunta fundamental que aún persiste es si el RE en las CCs de rata se comporta como un depósito que facilita la exocitosis al comportarse como una *fuentes* de Ca^{2+} o si deprime la liberación de CAs al hacerlo como un *sumidero* de Ca^{2+} . Con base en la observación de que en las CCs de ratón (CCM) la exocitosis estimulada de CAs aumenta significativamente después de la aplicación de CPA y se reduce levemente después de su lavado, mientras que en CCs de bovino (CCB) la secreción estimulada de CAs se reduce drásticamente después del tratamiento con CPA, pero tras su lavado se recupera rápidamente (figura 11) [91] [92]. Nuestros datos en CCs de rata demuestran que con el tratamiento con CPA el RE se comporta como en las CCBs, es decir, como una *fuentes* de Ca^{2+} que facilita la exocitosis de CAs.

Efecto de despolarizaciones recurrentes sobre los transitorios de Ca^{2+} de CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR bajo condiciones control

Como se mencionó previamente, con el protocolo de estimulación utilizado en este estudio (8 pulsos de alto K^+ de 1 s de duración cada 30 s) se observó un marcado decaimiento de la respuesta amperométrica en las CCs de rata (figura 14C, D). Surgió entonces la pregunta de si bajo las mismas condiciones de estimulación repetitiva las señales de Ca^{2+} subyacentes también disminuirían o si, al contrario, permanecerían estables.

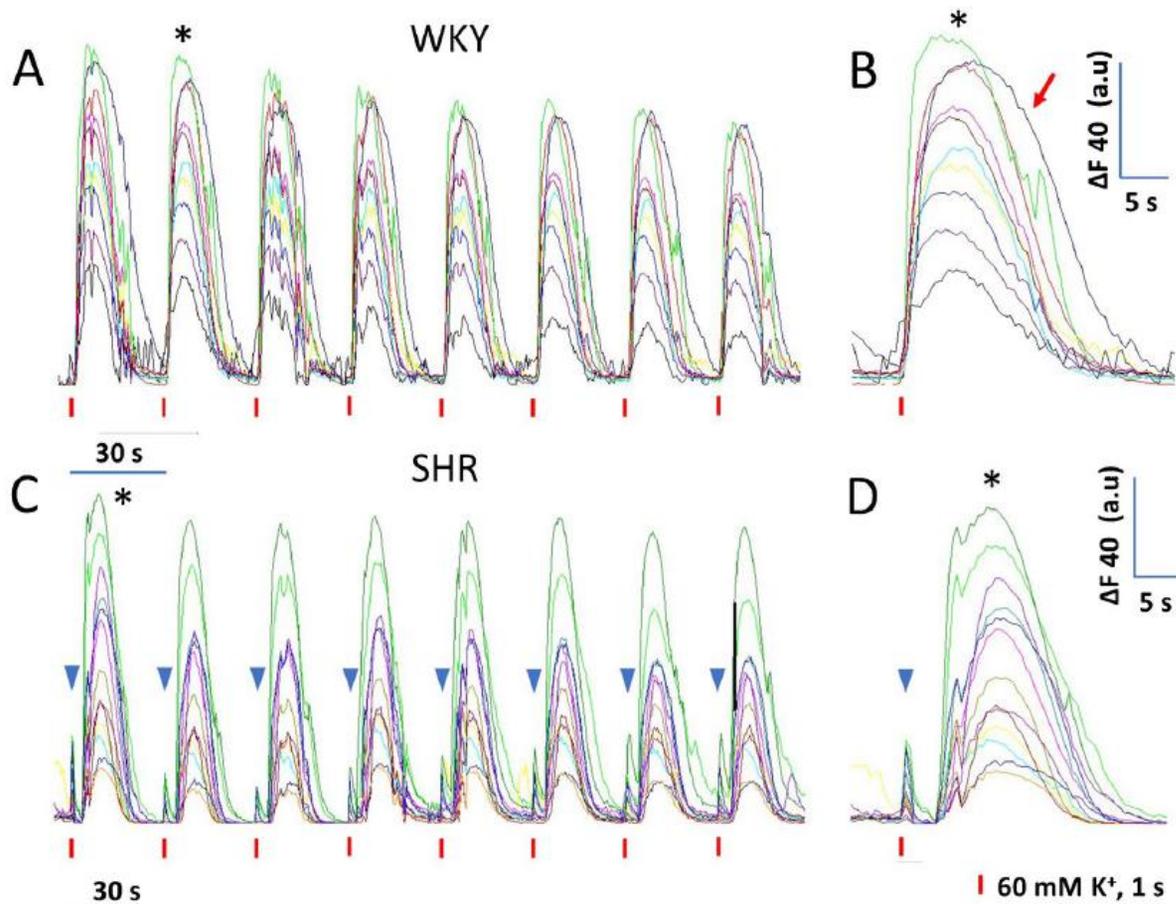


Figura 16. Señales de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por despolarizaciones repetitivas de células cromafines de ratas WKY y SHR bajo condiciones control. **A.** Diez CCs de ratas WKY fueron estimuladas con despolarizaciones recurrentes breves (1 s) cada 30 s. La respuesta de cada CC se muestra en diferentes colores. La flecha roja señala un $t-[Ca^{2+}]_i$ cuya fase de decaimiento es pronunciadamente demorada (ver texto). **B.** Con una escala de tiempo expandida se muestra el $t-[Ca^{2+}]_i$ inducido por el segundo estímulo despolarizante en A. **C.** $t-[Ca^{2+}]_i$ de 13 CCs de rata SHR sometidas a despolarizaciones repetitivas. La mayoría de estas células en ese campo visual presentan los componentes temprano y tardío su señal. El $t-[Ca^{2+}]_i$ inducido por el 1er estímulo (asterisco) se muestra en **D** con una escala de tiempo más grande en la que se distinguen con claridad los componentes temprano y tardío de la señal de Ca^{2+} . Además, el componente tardío muestra dos fases: una rápida, que llega a un pico y decae y otra más lenta y de mayor amplitud, posterior a la primera. El triángulo azul señala el componente temprano de cada señal de Ca^{2+} . Un registro de señales de $[Ca^{2+}]_i$ bifásicas representativo de CCs de ratas WKY y un registro representativo de señales de $[Ca^{2+}]_i$ monofásicas de CCs de SHR se muestra en la figura S1.

La figura 16 muestra el efecto de la estimulación repetitiva sobre los $t-[Ca^{2+}]_i$ de CCs de ratas WKY y SHR en condiciones control. Para nuestra sorpresa observamos que, a diferencia de la respuesta amperométrica, la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]_i$ tan solo decae un poco en el tiempo. Cuando se disminuye la frecuencia de la estimulación (a una cada 1 min), la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]_i$ decae todavía menos. No obstante, para analizar las propiedades de los $t-[Ca^{2+}]_i$ no se empleó la amplitud ya que este parámetro por sí solo no es un fiel reflejo de la movilización de Ca^{2+} inducida por el régimen de estimulación utilizado en este estudio. Además, algunas CCs presentan $t-[Ca^{2+}]_i$ con dos picos, lo que podría llevar a sesgos en el

análisis. Así, los parámetros que se utilizaron para analizar y comparar los $t-[Ca^{2+}]$ fueron el ancho del $t-[Ca^{2+}]$ al 50% de la carga de la onda (HW) y el área normalizada (NA) bajo la curva del $t-[Ca^{2+}]$. Como se observa en la figura 17, la despolarización repetitiva de las CCs bajo condiciones control hacen que el HW se acorte de 9.9 ± 0.4 s (2do estímulo) a 9.5 ± 0.3 s (8vo estímulo; $n = 65$ CCs) en ratas WKY, y de 11.6 ± 0.2 s (2do estímulo) a 11.4 ± 0.3 s (8vo estímulo; $n = 68$ CCs) en ratas SHR (figura 17A, C). Al mismo tiempo, el NA también disminuye de $89.0\% \pm 2.5$ (2do estímulo) a $65.1\% \pm 2.7$ (8vo estímulo; 65 CCs) en ratas WKY, y de $85.1\% \pm 1.2$ (2do estímulo) a $65.9\% \pm 1.8$ (8vo estímulo; $n = 68$ CCs) (figura 17B, D). Estos datos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Decaimiento de la señal de $[Ca^{2+}]$ en células cromafines no tratadas de ratas WKY y SHR sometidas a estimulación repetitiva. El ancho a la mitad y el área normalizada bajo la curva de los $t-[Ca^{2+}]$ producidos por despolarización de la membrana plasmática (estímulos 2 a 8) se compararon con las señales de Ca^{2+} gatilladas por el 1er estímulo. ($n = 65$ CCs de 3 ratas WKY; $n = 68$ CCs de 4 ratas SHR). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Control		Cinética de la señal de Ca^{2+} comparada con la respuesta al 1er estímulo						
		P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Ancho medio	WKY	96.7 ± 1.8	95.2 ± 2.0	95.4 ± 2.4	94.8 ± 2.3	95.5 ± 2.3	92.0 ± 2.0	92.4 ± 2.3
	SHR	94.6 ± 0.8	92.7 ± 0.8	92.9 ± 0.8	95.9 ± 1.3	95.7 ± 1.0	97.4 ± 1.6	96.5 ± 1.6
Área normalizada	WKY	89.0 ± 2.5	84.6 ± 2.6	76.2 ± 2.7	76.2 ± 2.6	70.9 ± 2.2	72.3 ± 3.6	65.1 ± 2.7
	SHR	85.1 ± 1.2	79.0 ± 1.3	78.0 ± 1.6	73.8 ± 1.6	71.9 ± 1.7	67.5 ± 1.6	65.9 ± 1.8

Así, en contraste con la respuesta amperométrica en la que ocurre una caída abrupta de la exocitosis luego del 1er estímulo, el HW de la señal de Ca^{2+} permanece relativamente estable bajo el mismo protocolo de estimulación repetitiva en CCs, tanto de ratas WKY como en CCs de ratas SHR (figura 17A, C). En cuanto al NA de los $t-[Ca^{2+}]$ este decae gradualmente, aunque en una proporción relativamente pequeña. Para el 8vo estímulo la caída es de un 23.9% en CCs de ratas WKY y un 19.2% en CCs de ratas SHR en comparación con el segundo estímulo. (figura 17B, D).

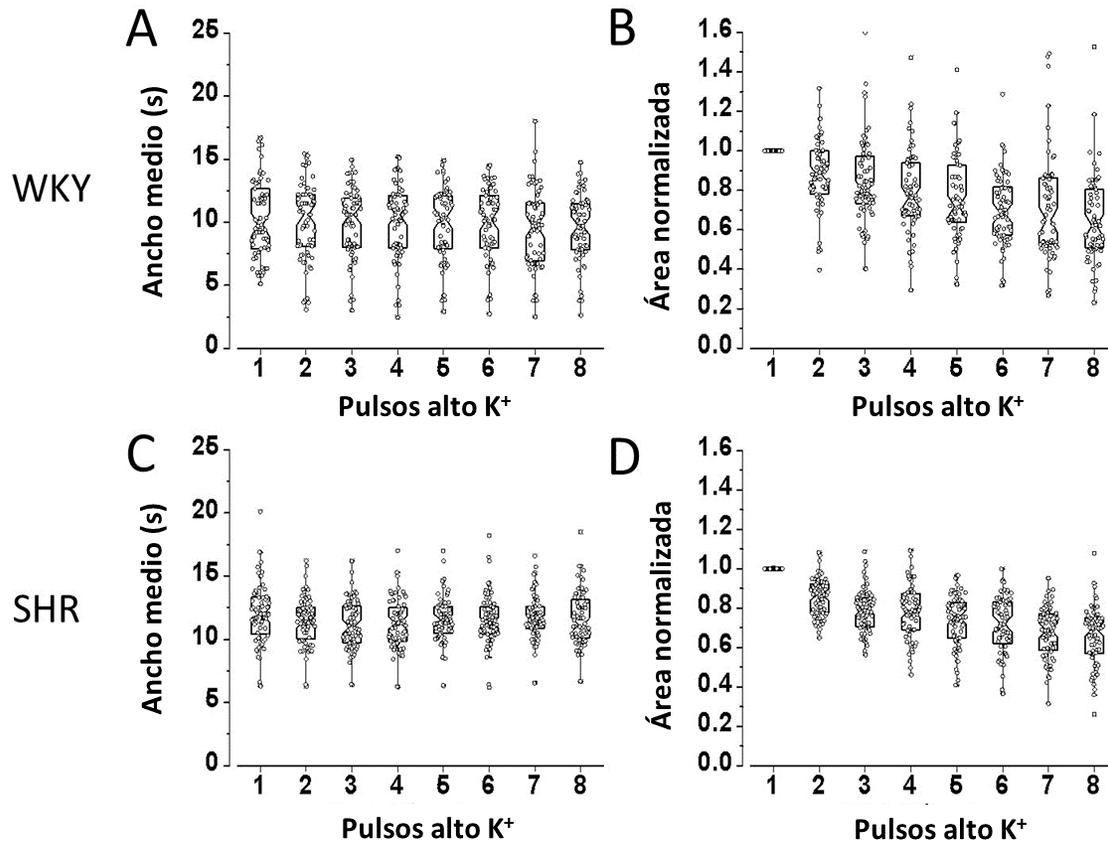


Figura 17. Cambios en el ancho medio y el área normalizada de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ de células cromafines de ratas WKY y SHR sometidas a despolarizaciones repetitivas. Las CCs fueron estimuladas con 8 pulsos de alto K^+ de 1 s en duración cada 30 s. El ancho medio y el área normalizada son dos parámetros que reflejan el comportamiento cinético de la señal de Ca^{2+} . En **A** y **B** se muestran gráficos híbridos de la evolución del ancho medio y el área normalizada de los $t-[Ca^{2+}]_i$ inducidos por estímulos repetitivos de CCs de ratas WKY. En **C** y **D** se aprecian los cambios en el ancho medio y el área normalizada de las señales de Ca^{2+} después de estimulación sucesiva de CCs de ratas SHR. Es claro que el ancho medio de los $t-[Ca^{2+}]_i$ permanece relativamente estable durante los estímulos recurrentes. Al contrario, el área normalizada decae gradualmente hasta el 8vo estímulo. Ver detalles en tablas 3 y 4. A y B 65 CCs; C y D 68 CCs.

Identificación de varios componentes en los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ causados por despolarización en CCs de rata

Los $t-[Ca^{2+}]_i$ registrados en CCs de rata después de 1 s de despolarización presentan algunas características cinéticas que se habían pasado por alto en estudios previos. En la mayoría de las CCs registradas los $t-[Ca^{2+}]_i$ comienzan de inmediato después de la llegada del estímulo despolarizante y están compuestos por una fase inicial de subida rápida que llega al pico en unos 9 s aproximadamente seguida por una caída suave que llega a la línea de base

dentro de los siguientes 10 a 15 s (figura 16A, B). En algunos de estos $t-[Ca^{2+}]_i$ la fase de caída demora un poco más (flecha roja en figura 16B) y en otros casos presenta pequeñas jorobas (trazo verde en figura 16B), lo que sugiere una persistencia de flujos de Ca^{2+} después de la despolarización inicial. Por su parte, en algunas otras CCs, la despolarización desencadena $t-[Ca^{2+}]_i$ que presentan dos componentes con características cinéticas diferentes: un *componente temprano rápido* que llega al pico en unos 2-3 s seguido por un *componente tardío lento* que llega al pico en aproximadamente 10 s para luego retornar a la línea de base dentro de los 11-15 s siguientes. La figura 16C, D muestra el registro de imagenología de Ca^{2+} de algunas CCs que tienen $t-[Ca^{2+}]_i$ con estas características cinéticas. El triángulo azul señala el componente temprano del $t-[Ca^{2+}]_i$ y se observa que el tiempo que transcurre entre el primer componente y el segundo varía entre las diferentes CCs: en algunos casos la brecha temporal es corta (ver abajo) lo que hace que no se distinga bien un componente del otro en el transitorio de Ca^{2+} , mientras que en otros casos la demora es un poco mayor y entonces son fácilmente distinguibles el uno del otro. El porcentaje de CCs que presentan estos dos componentes en sus $t-[Ca^{2+}]_i$ es relativamente bajo: en las CCs de rata WKY fue de 11/145 = 7.6% (un registro de señales de $[Ca^{2+}]_i$ bifásicas representativo de CCs de ratas WKY se muestra en la figura S1) mientras que en las CCs de rata SHR fue de 19/150 = 12.6%.

Comparación del efecto de la aplicación de CPA sobre los $t-[Ca^{2+}]_i$ de CCs de ratas WKY normotensas y SHR hipertensas

La figura 15 muestra que en las CCs de rata el mecanismo de CICR es funcional, sugiriendo que ante un estímulo despolarizante el RE en estas células se comporta como una fuente de Ca^{2+} que amplifica la señal de $[Ca^{2+}]_i$. Si esto es así, entonces al bloquear la liberación de Ca^{2+} desde el RE con CPA debería observarse una reducción importante de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ gatillada por voltaje. La figura 18A muestra una imagen en código de colores del registro simultáneo de imagenología de Ca^{2+} de un conjunto de más de 40 CCs de rata SHR. Para estos registros de Ca^{2+} se estimularon las células con pulsos de alto K^+ de 1 s de duración cada 30 s, así: los primeros dos estímulos se dieron bajo condiciones control; luego se aplicó CPA y se liberaron los estímulos 3ro a 5to; acto seguido se removió el CPA y se dieron 5 pulsos despolarizantes más. Consistente con los registros amperométricos de la figura 15, se observa que el CPA disminuye la amplitud y la duración de los $t-[Ca^{2+}]_i$ de las CCs, sin embargo, la magnitud de la inhibición al aplicar CPA y la magnitud de la recuperación después de lavarlo **varía** de una célula a otra. En la figura 18B se muestra el registro de Ca^{2+} de 3 CCs individuales del conjunto que se muestra en la figura 18A y es notable la diversidad de atributos presentes en los $t-[Ca^{2+}]_i$ de las distintas células individuales del grupo. En particular, estas CCs

presentan el componente temprano y el componente tardío en sus $t-[Ca^{2+}]$ (la flecha azul indica el componente temprano). Se observa que la aplicación de CPA elimina el componente tardío del $t-[Ca^{2+}]$ afectando en menor medida el componente temprano; y esto se da tanto en las CCs de rata WKY como, en este caso, en las CCs de rata SHR.

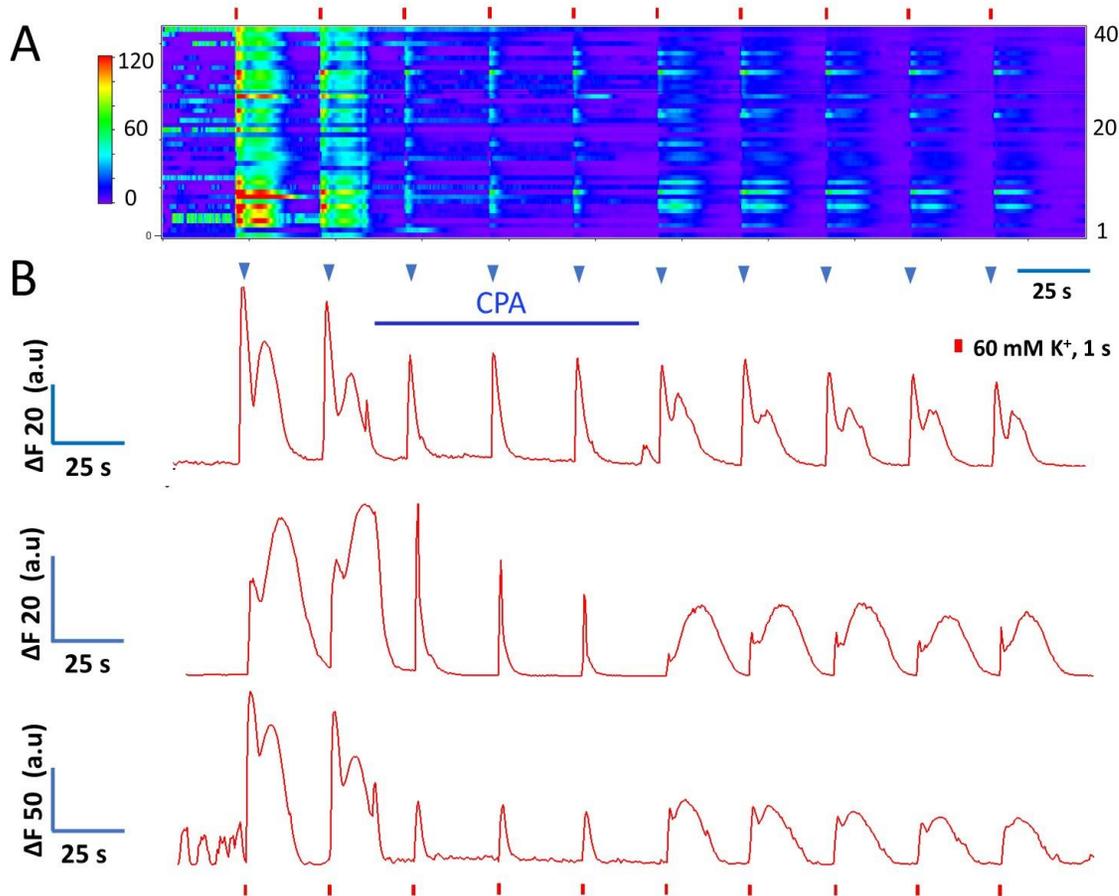


Figura 18. Efecto del CPA sobre los transitorios de $[Ca^{2+}]$ en respuesta a estímulos despolarizantes en células cromafines de rata. Se registró la señal de Ca^{2+} de CCs que fueron estimuladas con 10 pulsos de alto K⁺ de 1 s en duración cada 30 s antes, durante y después de la aplicación de CPA (10 μ M). **A.** Imagen en código de colores que muestra el registro de la señal de Ca^{2+} de 43 CCs. En el eje de las ordenadas se muestra el número de la célula y en el eje de las abscisas el tiempo. Los cambios en la fluorescencia ($\Delta F = F_i - F_0$) de cada célula varían de acuerdo con la escala de calibración a la izquierda. La aplicación de CPA, indicada por la barra horizontal, afecta la señal de Ca^{2+} en todas las CCs de manera similar. **B.** Se muestra el registro de Ca^{2+} de 3 CCs representativas extraídos de A que ejemplifican las características cinéticas de las señales de Ca^{2+} individuales y el efecto del CPA sobre éstas. Al suprimir gran parte del componente tardío, el CPA estrecha y disminuye la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]$. El triángulo azul indica el componente temprano de cada $t-[Ca^{2+}]$.

En virtud de que el CPA reduce la duración del $t-[Ca^{2+}]$ de las CCs (figura 18B), el HW pasa de 10.3 ± 0.3 s (promedio de las respuestas al estímulo 1 y 2 \pm SEM) a 3.8 ± 0.3 s (promedio de las respuestas a los estímulos 3, 4 y 5 \pm SEM; $n = 80$ CCs, p -valor < 0.001) y de 11.9 ± 0.6 s

(promedio de las respuestas al estímulo 1 y 2 \pm SEM) a 3.3 ± 0.2 s (promedio de las respuestas a los estímulos 3, 4 y 5 \pm SEM; $n = 82$ CCs, p -valor < 0.001), en CCs de ratas WKY y SHR, respectivamente. Estos datos están resumidos en la figura 19A, C. El porcentaje de reducción del HW al aplicar CPA (respuesta al estímulo 2 vs respuesta al estímulo 3) es significativamente mayor en CCs de ratas SHR (73.1 ± 1.2 %) que en CCs de ratas WKY (68.5 ± 1.5 %; $n = 80$ CCs; p -value < 0.001). Estos efectos sobre el HW de los t-[Ca²⁺] son completamente revertidos después del lavado del CPA en las CCs de **ambas** cepas de rata (figura 19A, C; estímulos 6 a 8; Tabla 5).

6

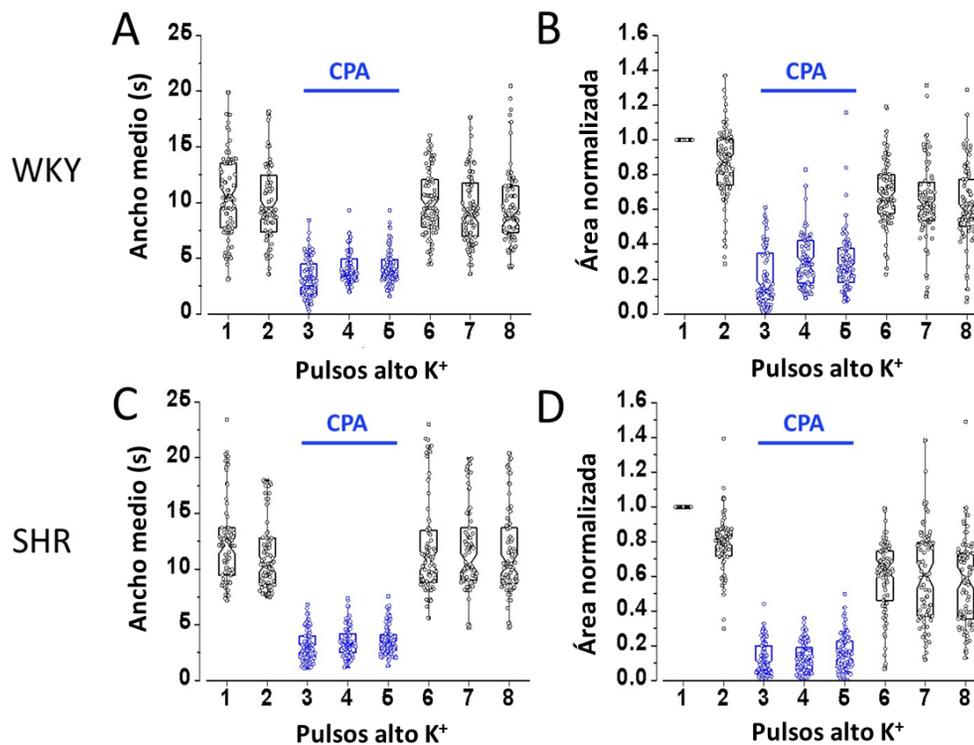


Figura 19. Efecto del CPA sobre el ancho a la mitad y el área normalizada de los transitorios de [Ca²⁺]_i inducidos por despolarización en células cromafines de ratas WKY y SHR. Las CCs fueron estimuladas con 8 despolarizaciones consecutivas con alto K⁺ de 1 s en duración cada 30 s. Los estímulos 1ro y 2do fueron suministrados bajo condiciones control y después se aplicó CPA durante 90 s mientras se dieron los estímulos 3ro, 4to y 5to. Luego se lavó el CPA y se dieron 3 despolarizaciones más. **A y C** muestra gráficos híbridos del ancho a la mitad de los t-[Ca²⁺] antes, durante y después de la aplicación de CPA (10 μ M) en CCs de ratas WKY y SHR, respectivamente. En **B y D** se observan gráficos híbridos del área normalizada de las señales de Ca²⁺ antes, durante y después de la aplicación de CPA en CCs de ratas WKY y SHR, respectivamente. Ver detalles en tablas 3 y 4. **A y B** 80 CCs; **C y D** 82 CCs.

El impacto del CPA sobre el NA de los t-[Ca²⁺] de las CCs se resume en las figura 19B, D. El NA disminuye drásticamente de 0.93 ± 0.07 (respuesta a estímulos 1 y 2; media \pm SEM) a 0.27 ± 0.03 (respuesta a estímulos 3, 4 y 5; media \pm SEM; $n = 80$ CCs; p -valor < 0.01) en CCs

de ratas WKY; mientras que en CCs de ratas SHR se reduce de 0.89 ± 0.10 (respuesta a estímulos 1 y 2; media \pm SEM) a 0.14 ± 0.01 (respuesta a estímulos 3, 4 y 5; media \pm SEM; $n = 82$ CCs; p —valor < 0.01). De esta manera, el CPA reduce el NA de los $t-[Ca^{2+}]_i$ un 71% y un 84% en CCs de ratas WKY y SHR, respectivamente, aunque la diferencia no es significativa (p —valor = 0.052). Después de lavar el CPA el NA no se recupera completamente (figura 19B, D; estímulos 6 a 8; Tabla 5), en parte por el decaimiento normal del $t-[Ca^{2+}]_i$ (figura 17B, D) y en parte quizá por un efecto residual del CPA.

Tabla 5. Inhibición de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ por CPA en células cromafines de ratas WKY y SHR. El porcentaje del ancho a la mitad (HW) y el área normalizada (NA) de los $t-[Ca^{2+}]_i$ inducidos por despolarización (estímulos P3 a P5) se comparó con el HW y el NA de las señales de Ca^{2+} después de retirar el CPA (estímulos P6, P7 y P8). $n = 80$ CCs de 3 ratas WKY; $n = 82$ CCs de 4 ratas SHR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; calculado respecto al promedio de P3 a P5.

Efecto del CPA		Efecto del CPA sobre la cinética de la señal de Ca^{2+} comparada con la respuesta al 2do estímulo					
		CPA			Lavado		
		P3	P4	P5	P6	P7	P8
Ancho medio	WKY	31.5 ± 1.5	41.5 ± 1.6	41.7 ± 1.9	97.8 ± 1.3 ***	93.9 ± 1.3 **	95.4 ± 1.2 **
	SHR	26.9 ± 1.2	30.5 ± 1.2	31.9 ± 1.3	94.6 ± 2.2 **	96.0 ± 1.7 **	98.7 ± 1.7 ***
Área normalizada	WKY	24.2 ± 2.1	35.5 ± 1.8	33.9 ± 1.9	80.4 ± 2.2 **	74.6 ± 2.1 **	71.8 ± 2.1 **
	SHR	15.5 ± 1.7	16.8 ± 1.8	19.8 ± 1.9	76.1 ± 3.3 **	77.4 ± 3.0 **	71.1 ± 2.5 **

En estudios previos en el laboratorio se demostró que después de un estímulo despolarizante los $t-[Ca^{2+}]_i$ de las CCs de ratas SHR tenían una amplitud 3.1 veces mayor que los de CCs de ratas WKY debido a una contribución significativamente mayor de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares en estas células [104]. Por esta razón supusimos que en CCs de ratas SHR el CPA tendría un efecto inhibitor sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ luego de una despolarización, en tanto que en las CCs de ratas WKY tendría un efecto facilitador de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, en el presente estudio se encontró que *el CPA inhibe los $t-[Ca^{2+}]_i$ disparados por despolarización en las CCs de ambas cepas de ratas*. Aun así, el CPA tuvo un efecto inhibitor de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ más potente en CCs de ratas SHR que en CCs de ratas WKY (ver figura S2 y S3), aunque no tan significativo como se esperaba. Este efecto inhibitor del CPA sobre las señales de $[Ca^{2+}]_i$ (figura 18) se corresponde con el efecto del CPA sobre las respuestas amperométricas (figura 15).

Tomando juntos los datos hasta este punto del estudio se pueden establecer dos conclusiones parciales:

1. El CPA inhibe por igual la exocitosis de CAs y la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR.

2. En cuanto al efecto comparativo del CPA sobre la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$, los datos sugieren que el retículo endoplásmico de las células cromafines de rata se comporta como una fuente de Ca^{2+} que facilita la secreción ante un estímulo, como ocurre en CCs de bovino y opuesto a lo observado en las CCs de ratón [91] [92].

Por lo concluido en el punto 1, en lo sucesivo decidimos agrupar los datos obtenidos de las CCs de ratas WKY y SHR sin distinción.

Efecto de la aplicación de CPA sobre las CCs de bovino

Uno de los hallazgos del presente estudio es que el RE de las CCs de rata se comporta como una fuente de Ca^{2+} para la exocitosis estimulada, similar a lo reportado en otros estudios para CCs de bovino [91]. Sin embargo, dado que los experimentos farmacológicos *in vitro* son susceptibles de variaciones debido a artefactos de la perfusión, diferentes velocidades de flujo, cambios locales de concentración de sustancias, tiempo en cultivo, temperatura, etc., decidimos llevar a cabo experimentos bajo exactamente las mismas condiciones de registro en CCs de una y otra especie.

Para comprobar si el RE en CC de rata se comporta de manera similar al RE de CCs de bovino bajo el tratamiento con CPA, se cultivaron CCBs y se les aplicó el mismo régimen de estimulación repetitiva e interrupción farmacológica de la liberación de Ca^{2+} del RE que se utilizó con las CCs de rata: primero se dieron dos estímulos de alto K^+ en condiciones control, luego se aplicó CPA (10 μ M) y se dieron los estímulos 3 a 5, finalmente se lavó el CPA y se dieron los estímulos 6 a 8. La figura 20A muestra un registro amperométrico representativo en una CC de bovino estimulada con 8 pulsos de alto K^+ de 1 s en duración cada 30 s. Cuando se aplica CPA, la respuesta amperométrica prácticamente desaparece (ver estímulos 3 a 5) y cuando se lava el CPA la respuesta amperométrica se recupera. La figura 20B muestra un registro de señales de Ca^{2+} en un grupo de >40 CCs de bovino. Se observa que al aplicar CPA tanto la amplitud como la duración de los $t-[Ca^{2+}]_i$ se reduce notablemente mientras que, al lavarlo, los $t-[Ca^{2+}]_i$ se recuperan parcialmente. En bovino prácticamente no se observaron CCs con dos componentes (componente temprano y tardío) en sus $t-[Ca^{2+}]_i$. No se llevaron a cabo experimentos adicionales en las CCs de bovino puesto que no eran estas células el objetivo principal de la presente investigación. No obstante, dado que los efectos del CPA sobre la exocitosis de CAs y las señales de $[Ca^{2+}]_i$ de las CCs de bovino (figura 20) son indistinguibles de los efectos observados en las CCs de rata (figuras 15 y 18), se comprueba una de las principales conclusiones de este trabajo.

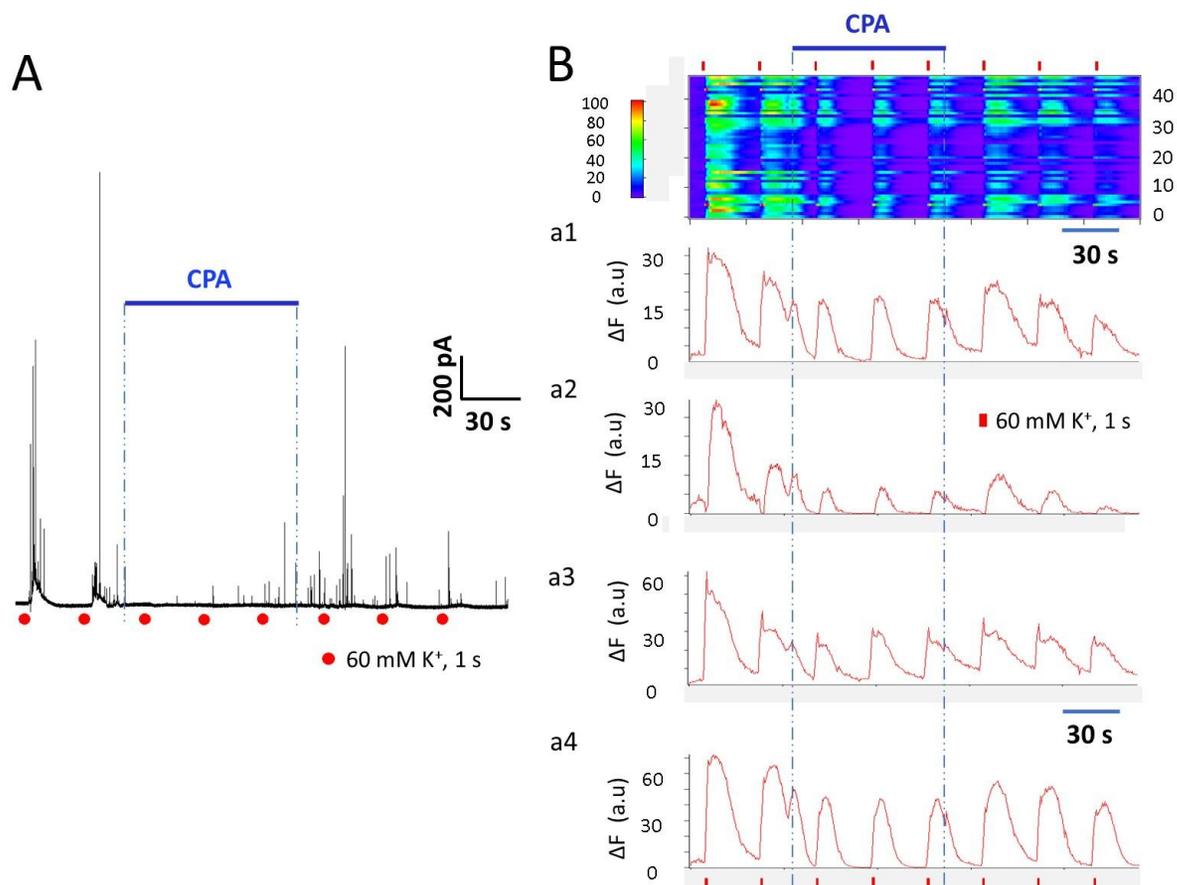


Figura 20. Efecto del CPA sobre la respuesta amperométrica y las señales de $[Ca^{2+}]_i$ en células cromafines de bovino. **A.** Ejemplo de un registro amperométrico de una CC de bovino (CCB) en el que se observa que el CPA suprime significativamente la descarga de espigas amperométricas (estímulos 3ro a 5to). Después de retirar el fármaco, la respuesta amperométrica reaparece de manera robusta (Estímulos 6to a 8vo). **B.** La imagen representa el registro de $[Ca^{2+}]_i$ de 45 CCBs. El eje y representa el número de la célula y el eje x el tiempo. Los cambios en la fluorescencia ($\Delta F = F_i - F_0$) de cada célula varían de acuerdo con la escala de calibración a la izquierda. Se suministraron 8 estímulos despolarizantes y entre los pulsos 3ro a 5to se aplicó CPA (10 μ M). después del lavado del inhibidor, la respuesta se recupera parcialmente. **a1— a4:** Trazos de cuatro CCBs representativas (de las que se graficaron en B) en los que se aprecian las características de sus señales de $[Ca^{2+}]_i$ y el efecto que tiene el CPA sobre sus cinéticas. Se observa que el fármaco disminuye de manera significativa y reversible el ancho medio y el área normalizada de los $t-[Ca^{2+}]_i$.

Efecto de la aplicación de rianodina sobre los parámetros cinéticos de los $t-[Ca^{2+}]_i$ de las CCs de rata

La figura 21A muestra un experimento diseñado para conocer más sobre el mecanismo que subyace a las distintas características cinéticas que se observan en los $t-[Ca^{2+}]_i$ inducidos

por despolarización de las CCs de rata. Esta figura muestra el registro de 5 CCs que fueron estimuladas con pulsos de alto K^+ de 1 s en duración cada 30 s. El 1er y 2do estímulos se aplicaron en condiciones control y producen $t-[Ca^{2+}]$ con los dos componentes mostrados **anteriormente** (la flecha azul señala el componente temprano). Se aplicó rianodina ($10 \mu M$), un fármaco que bloquea de manera específica a sus receptores (RyR) en el RE, 15 s antes de aplicar los estímulos 3ro, 4to y 5to, y se observa que los $t-[Ca^{2+}]$ en respuesta a dichos estímulos tienen una duración disminuida hasta que desaparece el componente tardío, afectándose en menor medida al componente temprano. Al retirar la rianodina se aplicaron cinco estímulos más y se nota que la duración del $t-[Ca^{2+}]$ aumenta de nuevo a la vez que reaparece el componente tardío. La inhibición predominante del componente tardío por rianodina y CPA, los cuales bloquean la respuesta al $[Ca^{2+}]_i$ del RE por vías diferentes, sugieren fuertemente que este componente representa mayoritariamente la contribución de la CICR (ver discusión).

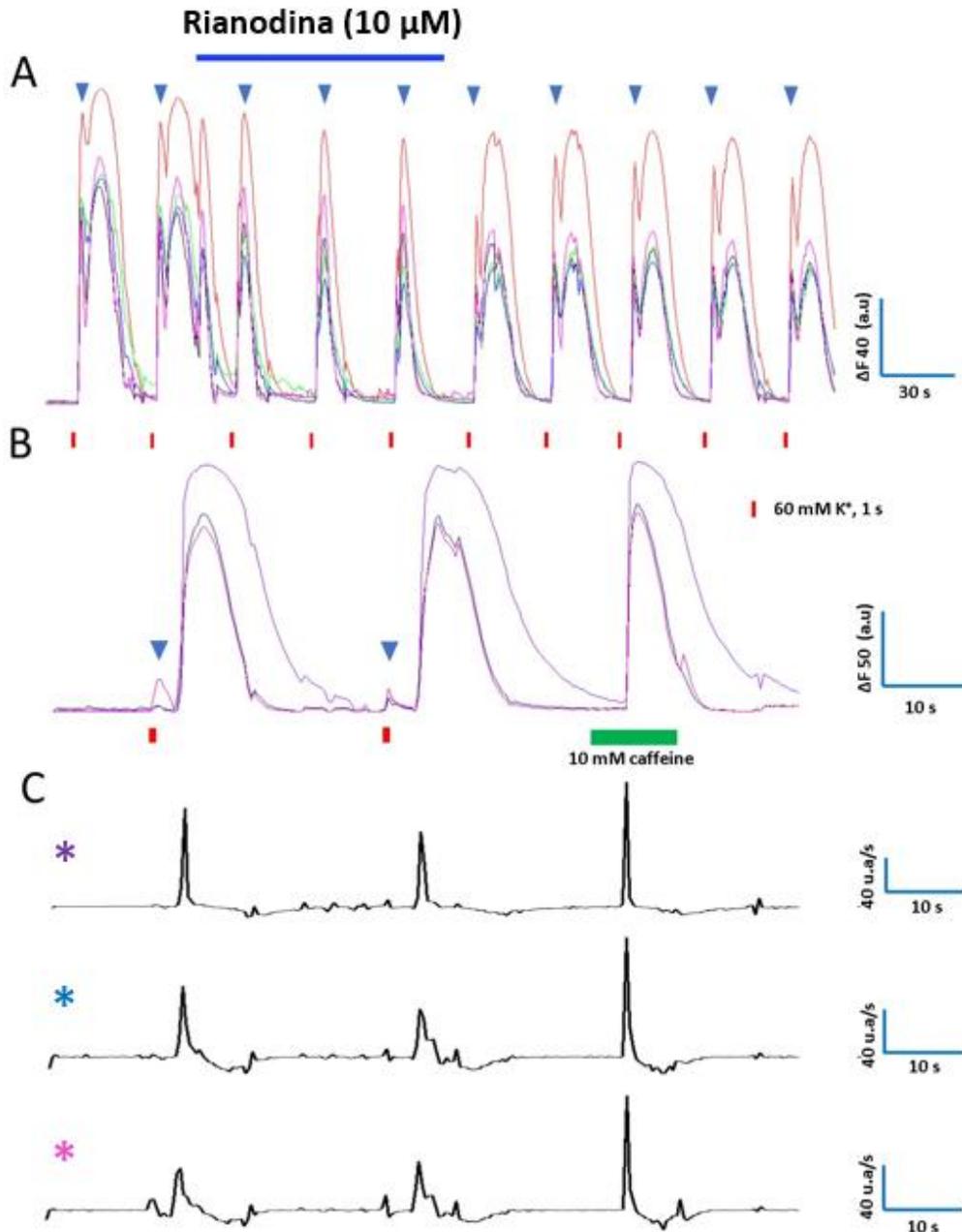


Figura 21. Efecto de la rianodina y la cafeína sobre las señales de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por voltaje. **A.** Efecto de la rianodina. Cinco CCs de rata fueron estimuladas con despolarizaciones sucesivas mientras se registraban sus señales de $[Ca^{2+}]_i$ antes, durante y después de la aplicación de $10 \mu\text{M}$ de rianodina (Ry) durante 90 s. Estas CCs despliegan los componentes temprano y tardío en sus $t-[Ca^{2+}]_i$. El componente temprano está indicado con un triángulo azul. Se observa que, tras su aplicación, la Ry estrecha significativamente los $t-[Ca^{2+}]_i$ disminuyendo en gran medida al componente tardío sin afectar mucho al componente temprano de la señal. Después de retirar la Ry y estimular de nuevo a las células, los $t-[Ca^{2+}]_i$ despliegan de vuelta el componente tardío a la vez que las señales recuperan su anchura (duración). **B.** Efecto de la cafeína. Se obtuvo el registro de $[Ca^{2+}]_i$ de 3 CCs que mostraban los componentes temprano y tardío separados por cierta latencia mientras eran estimuladas con pulsos de alto K^+ . Luego se aplicó cafeína (10 mM) durante 10 s, lo que produjo una prominente liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares sin que se aprecie ningún componente temprano en la señal. **C.** Trazos de la primera derivada de los $t-[Ca^{2+}]_i$ mostrados en B. El color de los asteriscos indica el $t-[Ca^{2+}]_i$ del cual se obtuvo el cálculo de la primera derivada. Explicación en el texto.

El bloqueo del influjo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje para evaluar su participación en los componentes temprano y tardío de los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ no tiene sentido pues elimina completamente participación de este ión. En contraste, la cafeína, la cual induce por sí misma la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, se aprovechó para afectar selectivamente el componente del $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ que resulta de la liberación intracelular de Ca^{2+} . La figura 21B muestra el registro de Ca^{2+} de 3 CCs. Los dos primeros estímulos producen $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ con un pequeño componente temprano seguido de un prominente componente tardío. Cuando se adicionó cafeína (10 mM, 10 s) se observó que, después de un retraso de aproximadamente 5 s, se produjo la liberación de Ca^{2+} desde pozas intracelulares. La cinética de la señal de Ca^{2+} inducida por la cafeína se parece a la del componente tardío, pero sin el componente temprano y con una fase de subida y de bajada más rápida (figura 21B). Como se ha reportado previamente, la demora en la aparición de la señal de Ca^{2+} es característica de la respuesta a cafeína [104]. Se realizaron experimentos adicionales para evaluar el efecto de la Ry —un bloqueador selectivo de los receptores de rianodina— sobre los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$. Para ello, se utilizó el mismo protocolo de estimulación usado para obtener los resultados de las figuras 18 y 19, pero empleando Ry en lugar de CPA. Como se resume en la figura 22, la rianodina reduce de manera reversible el HW y el NA de los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ de manera similar a como lo hace el CPA. El hecho de que los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ acortan su duración por efecto de la Ry y el CPA sugiere fuertemente que el componente tardío corresponde mayoritariamente a la contribución de la CICR mientras que el componente temprano probablemente se deba a la contribución de la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje.

Durante la aplicación de Ry los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ disminuyen su duración considerablemente (figura 21A), en consecuencia, el HW se reduce de 12.3 ± 0.1 s (media de los estímulos 1 y 2 \pm SEM) a 4.7 ± 0.1 s (media de los estímulos 3 a 5 \pm SEM; $n = 30$ CCs; $p\text{---}valor < 0.01$). El porcentaje de la reducción del HW (respuesta del estímulo 3 respecto al estímulo 2) fue de $63 \pm 1.9\%$. Estos datos se encuentran resumidos en la figura 22A. Los efectos de la Ry se revierten después de su lavado (figura 22A; estímulos 6 a 8). Por su parte, el impacto de la Ry sobre el NA de los $t\text{---}[\text{Ca}^{2+}]$ se resume la figura 22B. El NA disminuye significativamente desde $96 \pm 3.6\%$ (estímulos 1 y 2; media \pm SEM) a $30.6 \pm 0.3\%$ (estímulos 3 a 5; media \pm SEM; $n = 30$ CCs; $p\text{---}valor < 0.01$). La disminución porcentual del NA (respuesta del estímulo 3 respecto al estímulo 2) fue del $66.4 \pm 2.9\%$. Luego de remover la Ry el NA se recupera parcialmente (estímulos 6 a 8 en figura 22B), de manera similar a lo que sucede cuando se utiliza el CPA (figura 19A, 19B).

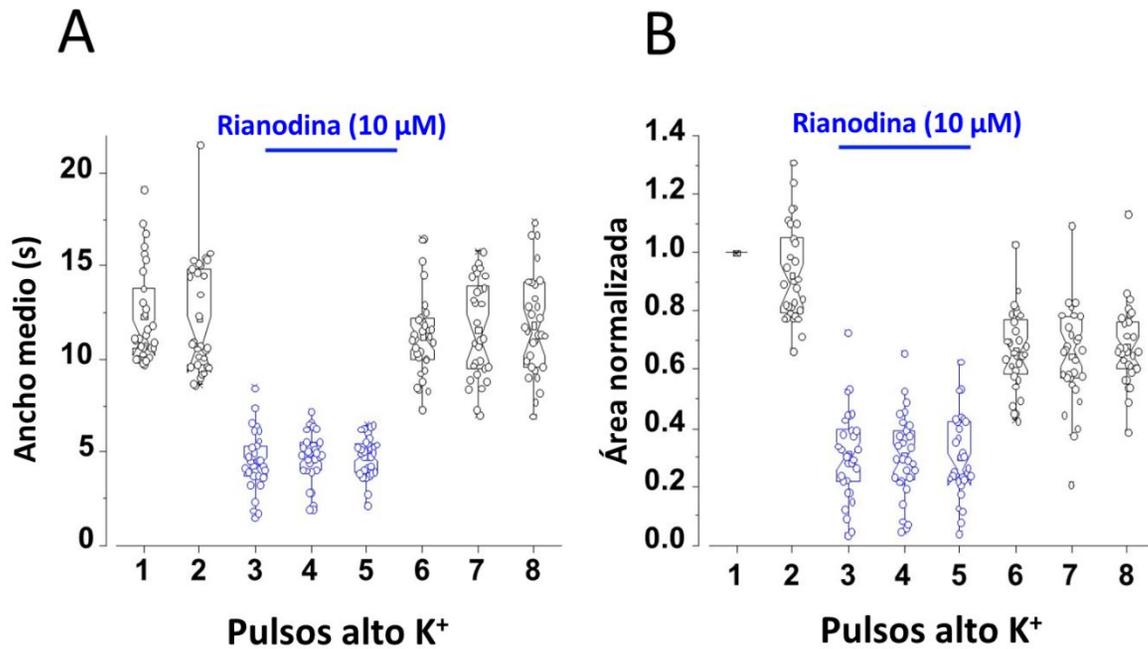


Figura 22. Efecto de la rianodina sobre la duración media y el área normalizada de los transitorios de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por voltaje en células cromafines. Las CCs de rata fueron estimuladas con 8 pulsos despolarizantes de 1 s en duración cada 30 s. Los primeros dos estímulos se dieron en condiciones control; luego se aplicó Ry (10 μ M) durante 90 s mientras los estímulos 3ro, 4to y 5to fueron suministrados; finalmente se retiró la Ry y se liberaron los estímulos 6to a 8vo. **A y B** muestran, respectivamente, la evolución del ancho medio y el área normalizada de los $t-[Ca^{2+}]$ durante la estimulación repetitiva antes, durante y después de la aplicación de Ry. $n = 30$ CCs en **A** y **B**.

Registro simultáneo de señales de Ca^{2+} y espigas amperométricas en CCs individuales

En algunas CCs de rata se observó que después de un estímulo despolarizante se presentaban dos ráfagas de descargas amperométricas (figura 14A; figura 15A, B; asteriscos negros). De forma correspondiente, después del mismo estímulo, algunas CCs presentaban un componente temprano y un componente tardío en sus $t-[Ca^{2+}]$. Estas observaciones nos llevaron a preguntar de si ambos fenómenos estarían relacionados. Para resolver esa pregunta, se realizaron registros simultáneos de imagenología de Ca^{2+} y amperometría para correlacionar la cinética de las señales de Ca^{2+} con la generación de espigas amperométricas. Dado que en las ráfagas de espigas amperométricas son difíciles de diferenciar, se calculó la carga acumulada en el tiempo. También se calculó la primera derivada de los registros de señales de Ca^{2+} para evaluar mejor la intensidad de los flujos de Ca^{2+} . La figura 23 muestra el análisis de la respuesta de 7 CCs representativas a un pulso despolarizante con alto K^+ de 1 s

en duración.

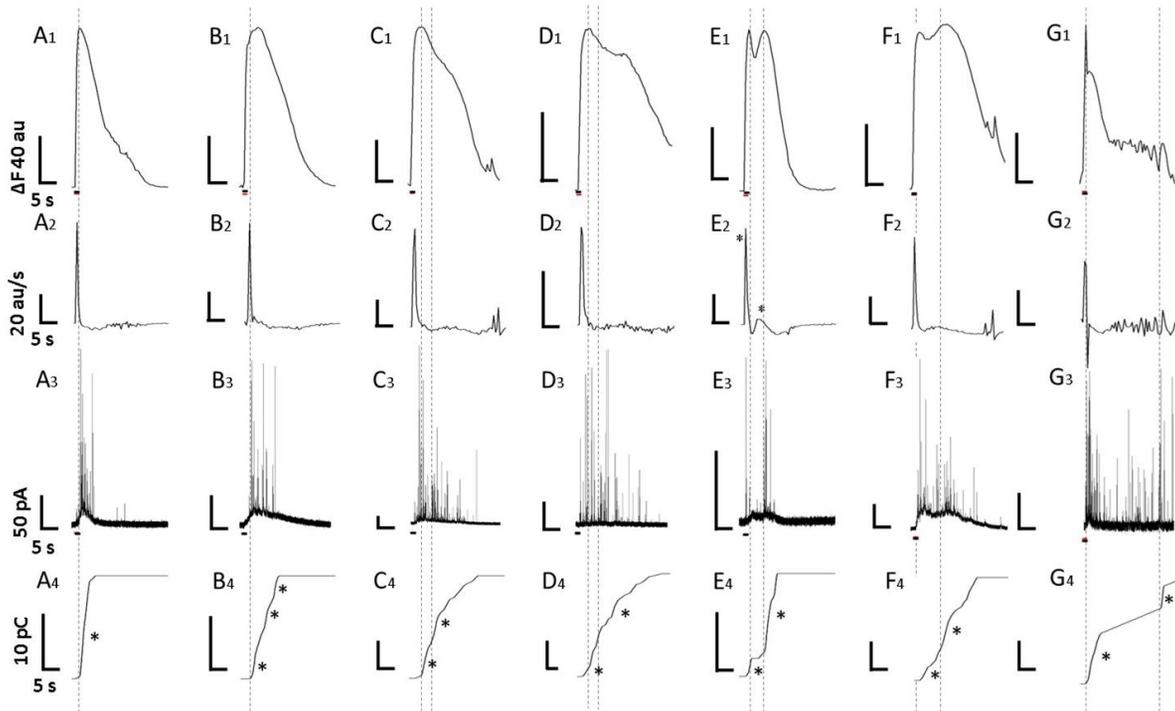


Figura 23. Registro simultáneo de señales de $[Ca^{2+}]_i$ y exocitosis de catecolaminas en células cromafines individuales de rata. Se registró la señal de $[Ca^{2+}]_i$ de 7 CCs representativas en respuesta a un estímulo despolarizante único de 1 s en duración (A_1 a G_1). A cada $t-[Ca^{2+}]_i$ se le calculó la primera derivada y su trazo se alineó temporalmente con la señal original (A_2 a G_2). La movilización de $[Ca^{2+}]_i$ producida por el estímulo despolarizante generó la exocitosis de CAs que se detectó por medio de registros amperométricos (A_3 a G_3) a los cuales se les calculó la integral para obtener la carga acumulada asociada (A_4 a G_4) cada 0.5 s. Se distinguen tres patrones de señales de $[Ca^{2+}]_i$ en CCs de rata. Los $t-[Ca^{2+}]_i$ tipo 1 (A_1), que son estrechos y presentan una subida rápida con un decaimiento lento. Los $t-[Ca^{2+}]_i$ tipo 2 (B_1 , C_1 , D_1), que son más duraderos con una fase de decaimiento en la que se pueden presentar protuberancias o jorobas breves. Finalmente, los $t-[Ca^{2+}]_i$ tipo 3 (E_1 , F_1), que presentan un componente temprano rápido seguido de un componente tardío lento separados por una latencia variable. También se registró una CC con un $t-[Ca^{2+}]_i$ no convencional (G_1) que presenta una subida rápida seguida de una joroba, una meseta y oscilaciones de amplitud creciente (explicación en el texto).

Se observan tres patrones diferentes de señales de Ca^{2+} :

Tipo 1: un $t-[Ca^{2+}]_i$ angosto, con una fase de subida rápida y un decaimiento lento (A_1), que tiene una primera derivada con un pico positivo único (A_2); que resulta en una ráfaga compacta única de espigas amperométricas (A_3), dando así lugar a un incremento escalonado único en la carga acumulada (A_4).

Tipo 2: un $t-[Ca^{2+}]_i$ de mayor duración que los primeros y con protuberancias ocasionales en la fase de caída. Las figuras B_1 , C_1 y D_1 muestran los registros de Ca^{2+} representativos de 3 CCs con $t-[Ca^{2+}]_i$ que se van haciendo más duraderos, respectivamente.

Este tipo de señales de Ca^{2+} se correlaciona con un pico positivo único al calcular su primera derivada (B2, C2 y D2); una ráfaga de espigas amperométricas que inicialmente es robusta pero que luego decae en frecuencia y que puede presentar ráfagas adicionales pequeñas (B3, C3 y D3); lo que produce un salto escalonado inicial de la carga acumulada seguido de pequeños incrementos graduales adicionales (B4, C4 y D4).

Tipo 3: Un $t-[\text{Ca}^{2+}]$ con dos componentes cinéticos diferenciados: un primer componente temprano rápido seguido de un segundo componente tardío lento. Las figuras E1 y F1 ejemplifican este tipo de señales de Ca^{2+} que se correlaciona con dos picos positivos en su primera derivada (asteriscos en E2, F2); lo que da lugar a dos ráfagas diferenciadas de espigas amperométricas (E3 y F3); con dos incrementos escalonados de la carga acumulada (asteriscos en E4 y F4).

Una CCs de este conjunto mostró un $t-[\text{Ca}^{2+}]$ con una cinética particular: consiste en un transitorio de Ca^{2+} con un decaimiento inicial rápido del que surge una "joroba" con una breve fase de meseta, seguida de oscilaciones que se van haciendo progresivamente más grandes hacia el final del registro (G1). La primera derivada de esta señal de Ca^{2+} resulta en un pico positivo prominente seguido de varias fluctuaciones pequeñas (G2). El registro amperométrico resultante tiene una robusta ráfaga de espigas en la etapa inicial a la que le sigue la emisión continua de picos con menor frecuencia, con la aparición de una ráfaga pequeña hacia el final, correlacionada con las fluctuaciones de Ca^{2+} . La carga acumulada muestra un incremento escalonado inicial al que le sigue una rampa durante la generación continua de espigas para terminar en un segundo aumento escalonado que se correlaciona con la fluctuación de Ca^{2+} más grande hacia el final del registro. Este análisis confirma que la cinética de las señales de Ca^{2+} intracelulares determinan los atributos de la señal amperométrica resultante.

Efecto de la aplicación de CPA en el registro simultáneo de señales de Ca^{2+} y espigas amperométricas en una misma CC

A manera de "prueba de concepto", se realizó el registro simultáneo de las señales de Ca^{2+} y la exocitosis de CAs antes, durante y después de la aplicación de CPA en una CC de rata que exhibía $t-[\text{Ca}^{2+}]$ con los dos componentes: el temprano rápido y el tardío lento. El 1er estímulo despolarizante produce un prominente $t-[\text{Ca}^{2+}]$ con los dos componentes casi fusionados (figura 24Aa1), lo que genera un registro amperométrico con dos ráfagas de espigas discernibles (figura 24Bb1, asterisco rojo y negro). El 2do estímulo despolarizante, 30 s después, origina un $t-[\text{Ca}^{2+}]$ más pequeño (con los dos componentes) que solo produce

espigas amperométricas continuas de menor frecuencia. Durante la aplicación de CPA el segundo componente del $t-[Ca^{2+}]$ desaparece (figura 24Aa2), y el componente temprano resultante provoca una respuesta amperométrica más pequeña (figura 24Bb2). Al retirar el CPA, el componente tardío del $t-[Ca^{2+}]$ reaparece (figura 24Aa3), a la vez que se observan nuevamente dos ráfagas de espigas amperométricas (figura 24Bb3). El último estímulo de la serie produce un $t-[Ca^{2+}]$ de menor amplitud que no genera casi espigas.

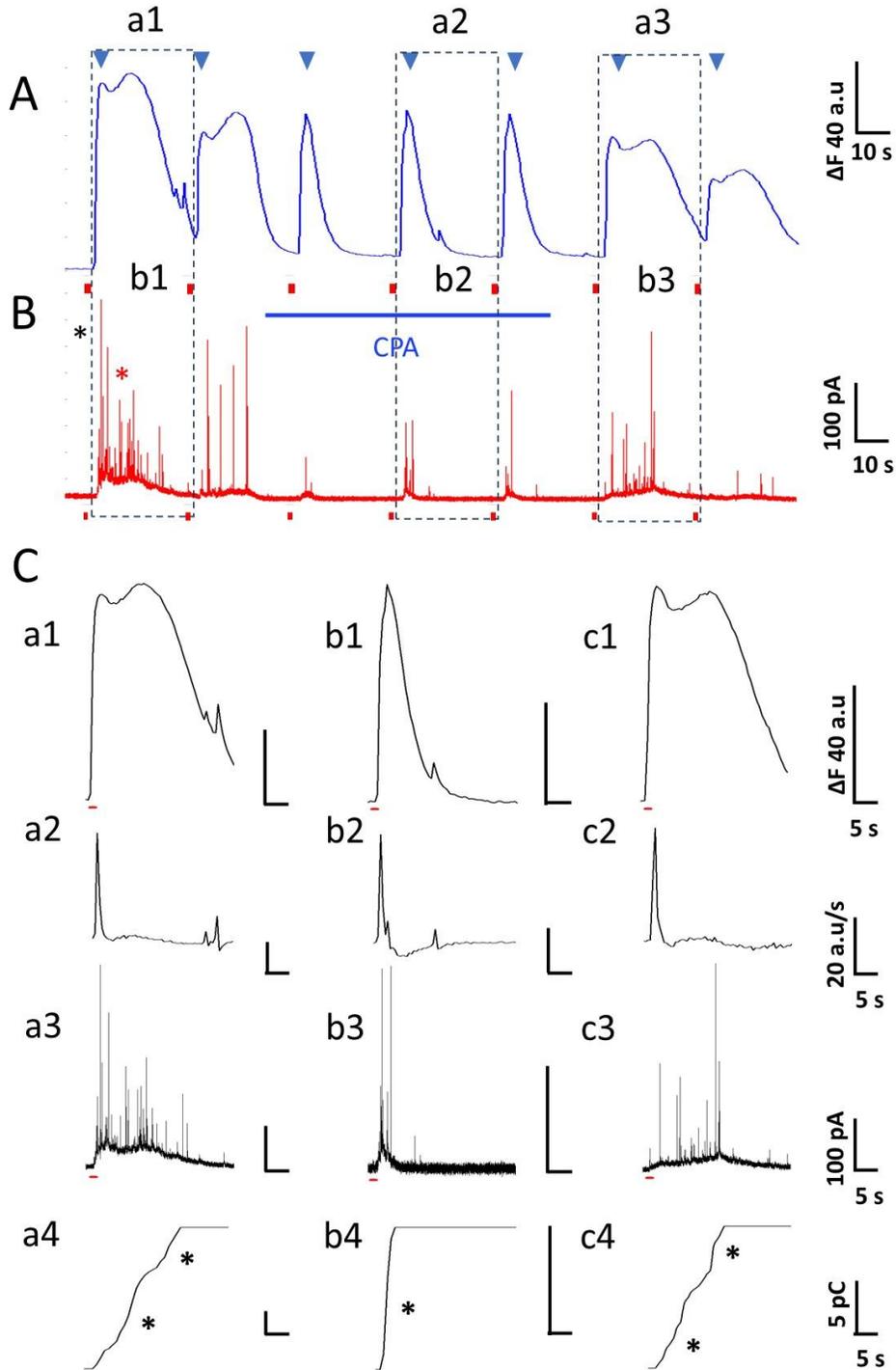


Figura 24. Registro simultáneo de señales de $[Ca^{2+}]_i$ y exocitosis de catecolaminas en CCs individuales antes, durante y después de la aplicación de CPA. A y B. Se registraron los $t-[Ca^{2+}]_i$ y las señales amperométricas generadas en respuesta a 7 pulsos despolarizantes de alto K^+ en CCs individuales. Los estímulos 1ro y 2do se suministraron bajo condiciones control y produjeron $t-[Ca^{2+}]_i$ con los componentes temprano y tardío casi fusionados (Aa1). Luego se aplicó CPA durante 90 s mientras se liberaban los estímulos 3ro, 4to y 5to, entonces los $t-[Ca^{2+}]_i$ se estrecharon a la vez que desaparecía el componente tardío (Aa2). Finalmente se lavó el CPA y se dieron los estímulos 6to y 7mo, que dieron lugar a $t-[Ca^{2+}]_i$ con el componente tardío de vuelta (Aa3). Las señales amperométricas correspondientes, registradas en la misma célula, muestran una descarga con dos ráfagas distinguibles de espigas amperométricas (Bb1, asteriscos negro y rojo). El $t-[Ca^{2+}]_i$ estrechado por el CPA produjo una descarga compacta de disparos amperométricos (Bb2). después de retirar el CPA y estimular a la célula se genera de nuevo una señal que expone dos ráfagas de espigas amperométricas (Bb3). C. Análisis antes, durante y después de aplicar CPA. El $t-[Ca^{2+}]_i$ control (Ca1), con los componentes temprano y tardío, produce: una primera derivada cuyo trazo expone un prominente pico positivo seguido de una joroba también positiva (Ca2); dos descargas de espigas amperométricas (Ca3); y dos saltos escalonados de la carga acumulada (Ca4). Durante la aplicación de CPA, el $t-[Ca^{2+}]_i$ estrecho (Cb1) genera: un único pico positivo en el trazo de la primera derivada (Cb2); una sola descarga compacta de espigas amperométricas (Cb3); y un brinco solitario de la carga acumulada (Cb4). Al retirar el fármaco, el $t-[Ca^{2+}]_i$ resultante del estímulo despolarizante (Cc1) presenta de nuevo los componentes temprano y tardío, además origina: un trazo de la primera derivada con un gran pico positivo seguido de una pequeña joroba positiva (Cc2); dos ráfagas de espigas amperométricas (Cc3); y dos pasos escalonados de la carga acumulada (Cc4).

A este registro se le aplicó el mismo análisis que en la figura 23. Tanto la amplitud del registro de Ca^{2+} como la del registro amperométrico se normalizaron para comparar. Como se observa en la figura 24C, el primer $t-[Ca^{2+}]_i$, que presenta los componentes temprano y tardío (figura 24Ca1), da lugar a una primera derivada con un pico positivo grande seguido de una pequeña "joroba" también positiva (figura 24Ca2); un registro amperométrico con dos ráfagas de espigas (figura 24Ca3), y dos incrementos escalonados de la carga acumulada (figura 24Ca4, asteriscos). Durante la aplicación de CPA el segundo componente desaparece, lo que resulta en un $t-[Ca^{2+}]_i$ más estrecho y pequeño (figura 24Cb1); una primera derivada con un solo pico positivo prominente (figura 24Cb2); una descarga amperométrica única y compacta (figura 24Cb3); y un solitario salto escalonado de la carga acumulada (figura 24Cb4, asteriscos). Al retirar el CPA, el $t-[Ca^{2+}]_i$ reaparece con los componentes temprano y tardío (figura 24Cc1); la primera derivada tiene un pico positivo inicial seguido de una "joroba" chica de polaridad positiva (figura 24Cc2); el registro amperométrico muestra dos ráfagas de espigas (figura 24Cc3); y la carga acumulada presenta —de nuevo— dos incrementos escalonados (figura 24Cc4).

Este nuevo análisis apoya fuertemente una de las principales conclusiones de esta segunda parte de la investigación: la existencia de una correlación robusta y predecible entre la cinética de la señal de Ca^{2+} intracelular y la velocidad de liberación de CAs a nivel de célula individual.

XIX. Discusión

En este trabajo se develan aspectos críticos de la función del RE en la movilización de Ca^{2+} tras despolarizar la membrana y las repercusiones que esta actividad de transporte tiene sobre la concentración de calcio libre en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la exocitosis de catecolaminas (CAs) en las CCs de rata. Mediante la evaluación de cambios en la fluorescencia de Ca^{2+} y la respuesta amperométrica inducidas por la aplicación de pulsos repetitivos de alto K^+ (60 mM, 1 s), se exploró la participación del RE en la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y exocitosis de CAs tras la entrada de Ca^{2+} en las CCs adrenales de rata, y se estudió si dichas respuestas difieren entre las CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR que tienen diferente ganancia del mecanismo de CICR. Se presentan experimentos que sugieren que el RE en las CCs de rata se comporta como un reservorio de Ca^{2+} con un mecanismo de CICR fuerte y una captación de Ca^{2+} débil. La intensidad relativa con la que el RE libera y capta Ca^{2+} ante la entrada estimulada del ión a la célula parece no tener repercusiones sobre la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs de las CCs de SHR cuando se comparan con las CCs de WKY, aunque la aplicación de CPA sí revela mayor liberación de Ca^{2+} desde el RE hacia el citosol en CCs de SHR.

En esta investigación mostramos por primera vez los efectos que tienen la estimulación repetitiva de CCs de ratas SHR y WKY sobre los transitorios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($t-[\text{Ca}^{2+}]_i$) y la secreción de CAs, y en el transcurso de este modo de activación, probamos la contribución del RE a estos dos procesos que son esenciales para entender los mecanismos detrás de la hipersecreción de CAs en el fenotipo hipertenso. Este paradigma de estimulación develó diferencias y semejanzas que permiten entender mejor el comportamiento hipersecretor de las CCs de ratas SHR, como se discutirá más adelante.

No obstante, el objetivo de este trabajo no solo fue evaluar diferencias entre CCs de ratas SHR y WKY. Otro propósito de la investigación tiene que ver con la fisiología celular comparada de las CCs de diferentes grupos de mamíferos de importancia en investigación. En el estudio de las CCs adrenales se han evidenciado claras diferencias en la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs entre diferentes especies de mamíferos [65]. Por ejemplo, las CCs de bovino (CCB) presentan un mecanismo eficiente de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) [115] mientras que, al carecer de receptores de rianodina (RyR), las CCs de ratón (CCM) no parecen tener este mecanismo muy desarrollado [116]. No obstante, se ha evidenciado la expresión de RyRs funcionales que promueven el mecanismo de CICR en CCs de ratones C57BL/6 [117]. En una publicación reciente, Martínez—Ramírez et al. [91] reporta el efecto de la inhibición reversible de la bomba SERCA por CPA sobre la exocitosis de CAs y la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulada por acetilcolina (ACh) en CCs de ratón y de bovino. En CCs de ratón el CPA

aumenta la exocitosis mientras que en CCs de bovino *disminuye* la exocitosis. Después de retirar el CPA la exocitosis se reduce en CCs de ratón, pero se incrementa en las CCs de bovino. Para explicar estos hallazgos, los autores sugieren que diferencias en el manejo de $[Ca^{2+}]_i$ por el RE y las mitocondrias podrían alterar el tráfico vesicular y el reabastecimiento del *pool* de gránulos de secreción listo para liberarse (PLL). Esta afirmación parte de la observación de que las mitocondrias capturan más Ca^{2+} en las CCs de ratón que en las CCs de bovino al ser estimuladas [89]. Sin embargo, estas diferencias no se pueden explicar solo por la influencia del transporte de Ca^{2+} hacia las mitocondrias pues el CPA, que usaron en su estudio, no afecta a estos organelos [86] [87]. Así, las discrepancias que encontraron en su investigación se explican mejor si se considera que las CCs de ratón y de bovino difieren en la *intensidad relativa* con que el RE realiza dos de sus principales funciones: la captura de Ca^{2+} y la liberación de Ca^{2+} . Por tanto, es razonable pensar que las CCs de ratón presentan una *fuerte* captura de Ca^{2+} y una *débil* CICR [116] mientras que las CCs de bovino presentan una *débil* captura de Ca^{2+} pero una *fuerte* CICR [91] [115]. El CPA inhibe los dos mecanismos: la captura de Ca^{2+} de manera directa y la liberación de Ca^{2+} de manera indirecta [92]. Empleando un protocolo de estimulación eléctrica repetitiva con intervención farmacológica con CPA, encontramos que el RE en CCs de rata se caracteriza por presentar una captación de Ca^{2+} débil y una liberación de Ca^{2+} fuerte. Al mismo tiempo demostramos que este comportamiento del RE en las CCs de rata es similar al que se presenta en las CCBs [91].

En el curso de esta investigación también encontramos que en las CCs de rata hay una gran heterogeneidad de señales de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación y una correlación robusta y predecible entre estas señales y la velocidad de secreción de CAs en la misma célula. Finalmente, demostramos por primera vez que la activación del mecanismo de CICR luego de un estímulo despolarizante se asocia con una fuerte respuesta secretora en estas células. Al final se propone un modelo que explica de manera sucinta la función del RE en la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis hormonal en las CCs de rata.

Dinámica de la exocitosis de CAs durante de la estimulación repetitiva de CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR bajo condiciones control

Miranda-Ferreira et al. [144] reporta que las CCs de ratas SHR presentan el doble de eventos únicos de exocitosis y cuatro veces más secreción de CAs por estímulo inicial que las CCs de ratas Sprague-Dawley (control normotenso) cuando son estimuladas con un pulso

despolarizante de alto K^+ , datos parcialmente consistentes con los hallazgos de este trabajo en el que se encuentra también el doble de eventos de secreción, aunque con una diferencia menos pronunciada en la cantidad de CAs secretadas con un valor tres veces mayor en nuestro caso (figura 14D) respecto a ellos que encuentran que este valor se cuadruplica. Esta disparidad probablemente se debe al uso de controles diferentes para comparar el fenotipo hipersecretor de CAs de las CCs de ratas hipertensas SHR. Al parecer las CCs de ratas WKY poseen un fenotipo secretor más parecido al de CCs de ratas SHR que las CCs de las ratas Sprague-Dawley del estudio de Miranda-Ferreira et al. [144]. Un resultado de nuestra investigación que fortalece esta hipótesis es que la duración de la secreción de CAs por estímulo es prácticamente igual entre las CCs de ratas SHR y WKY (figura 1A y 1B), mientras que Miranda-Ferreira et al. encuentran que la secreción de CAs tiene una duración menor en las CCs de las ratas Sprague-Dawley respecto a las CCs de ratas SHR luego de la apertura de los CaVs. Nuestro hallazgo denota que la duración de la secreción de espigas tras la despolarización no parece tener relevancia en el fenotipo hipersecretor que manifiestan las CCs de las ratas SHR cuando se comparan con las ratas WKY, sus descendientes normotensos. Esta observación coincide con la reportada por Segura—Chama et al. [104] empleando como control normotenso las CCs WKY, quienes encuentran que la saturación de la secreción de CAs ante un estímulo en CCs de WKY y SHR no difieren significativamente. En su investigación, Segura—Chama [104] también muestra que el número de espigas y la cantidad de CAs liberada ante un estímulo inicial es el doble en las CCs SHR respecto a las CCs WKY, diferencias que ya están presentes desde etapas pre-hipertensivas en estadios juveniles de los animales [118], datos que son similares a los observados en este trabajo ante un mismo estímulo inicial (Tabla 2). El hecho de que la exocitosis de CAs por las CCs sea más parecida entre ratas WKY y SHR que entre ratas Sprague-Dawley y SHR sugiere que los determinantes del fenotipo hipersecretor relacionados con la aparición de la hipertensión en las ratas SHR pueden dilucidarse de manera precisa cuando se comparan con la liberación estimulada de CAs de las CCs de WKY que cuando se utiliza otra cepa de rata no relacionada para hacer la misma comparación. Lo mismo aplica cuando se emplean ratas SHR jóvenes para hacer la comparación con ratas SHR adultas, pues el fenotipo hipersecretor comienza a presentarse en ciertas poblaciones de CCs al inicio de la vida de las ratas SHR [118].

El fenotipo de hipersecreción de CAs observado en CCs de SHR intactas ante un estímulo podría explicarse por la generación de señales de $[Ca^{2+}]_i$ de mayor amplitud debido a un fenómeno de CICR más robusto, como reporta Segura—Chama en su trabajo [104]. De manera alternativa (o complementaria), no solo una señal de Ca^{2+} más prominente explicaría el fenotipo secretor observado. Recientemente, Peña del Castillo et al. [118] reportó que las CCs de ratas SHR poseen 82% más gránulos cromafines (GCCs) por unidad de área citoplasmática que las CCs de ratas WKY, muchos de ellos acoplados a la membrana, lo cual

indicaría que el fenotipo hipersecretor de CAs en las CCs de estas ratas podría explicarse también por una mayor densidad de GCCs en estas células, lo que haría más probable la exocitosis estimulada que en su contraparte WKY. De acuerdo con los datos recabados en el presente estudio, la hipótesis que sustenta una mayor densidad de GCCs es la que parece corroborarse en este caso pues no se observan diferencias substanciales en la cinética de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ generadas por el 1er estímulo despolarizante (ver figura 16A y 16C, primer transitorio de $[Ca^{2+}]_i$). Una mayor densidad de GCCs en las CCs de SHR acoplados a la membrana podría indicar un *pool* de gránulos listo para liberarse (PLL) más prominente en estas células que en las de su contraparte, las ratas WKY.

En este trabajo se estudia de manera sistemática el efecto que tienen estímulos despolarizantes recurrentes, a intervalos cortos (30 s), sobre la exocitosis de CAs en CCs de ratas hipertensas SHR y normotensas WKY. Observamos que la exocitosis de CAs decae abruptamente después del 1er estímulo despolarizante en las CCs de SHR y, para el 3er estímulo, las diferencias en el número de espigas desaparecen respecto a las CCs de WKY (figura 14C y 14D), una observación similar a la reportada por Miranda-Ferreira et al. [144] al estimular estas células en tres ocasiones a intervalos de 5 minutos.

¿Por qué las CCs secretan cada vez menos gránulos cromafines (GCs) después del 1er estímulo? Es un hecho bien documentado que la magnitud y la duración de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ regulan la distribución de los GCCs entre los diferentes *pools* y su movilización para entrar en las fases de *docking*, *priming* y fusión con la membrana plasmática durante la exocitosis [66] [119]. No obstante, del reporte de Miranda-Ferreira et al. [144] no es posible descartar si el decaimiento abrupto de la secreción en las CCs de SHR después del 1er estímulo se debe a una correspondiente atenuación de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ pues no realizan mediciones de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ [144]. Aquí presentamos evidencia de que el decaimiento estrepitoso de la exocitosis estimulada de CAs en las CCs de SHR después del 1er estímulo no se debe a una alteración en la movilización del $[Ca^{2+}]_i$ pues la señal no decae abruptamente después del primer estímulo, sino que se mantiene (ver figura 16A y C), lo cual se discutirá en detalle en secciones más adelante.

Como es ampliamente conocido, el PLL es un pequeño conjunto de gránulos que se encuentran muy cerca de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CaVs) en el subplasmalema [28] [120], por lo que una explicación al decaimiento abrupto de la exocitosis en las CCs de ambos grupos de ratas es que el 1er estímulo vacía el PLL, lo que necesariamente obliga a la movilización de GCCs desde regiones adentro de la célula donde se halla el *pool* de reserva (PR) para reabastecer el PLL en la MP, proceso que demanda tiempo y energía (ATP) [122]. La demora que causa el transporte de gránulos para reabastecer el PLL haría que los

estímulos subsecuentes sean menos efectivos para la secreción de CAs. El concepto del PLL también podría explicar las diferencias que se observan en la velocidad de secreción de CCs de ratas WKY y SHR. En este sentido, es probable que las CCs de ratas SHR sin estimular contengan una mayor cantidad de GCCs en el PLL que las CCs de ratas WKY, de manera que ante el 1er estímulo se presentan más eventos de liberación (mayor número de espigas) con mayor contenido de CAs (mayor carga acumulada) en las primeras con respecto a las segundas [121]. Así mismo, la disminución de GCCs suplementarios del PLL después del 1er estímulo también podría explicar por qué las diferencias en el número de espigas y la carga acumulada entre las CCs de ratas WKY y SHR desaparecen con la estimulación repetitiva (ver figura 14C, D; tabla 2). Ambos parámetros cinéticos de la exocitosis decaen también después del 1er estímulo en CCs de ratón y de bovino cuando son estimuladas a intervalos de 60 s, con mayor velocidad de caída en las primeras que en las segundas [91].

Nuestro hallazgo de que la hipersecreción de CAs reportada en CCs de ratas SHR disminuye o incluso desaparece después de estímulos consecutivos podría ser relevante respecto de la contribución que podrían tener las CCs en la fisiopatología de la hipertensión.

Efecto del CPA sobre la exocitosis de CAs en CCs de ratas WKY y SHR

El CPA es una micotoxina producida por ciertos hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* que bloquea de manera específica la bomba SERCA [143]. Su efecto sobre el bombeo de Ca^{2+} hacia el RE es reversible y dependiente de la concentración [94]. Este bloqueo reversible, con la concentración y tiempo utilizado, tiene dos propósitos en nuestro planteamiento experimental: i) la disminución transitoria de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ en un 40-50% de su capacidad y, ii) la interrupción de la liberación *estimulada* de Ca^{2+} hacia el citosol a través de los RyR por el mecanismo de CICR [141]. Si el RE intacto funciona originalmente como una fuente de Ca^{2+} entonces al aplicar CPA se debería observar una depresión de la exocitosis; por el contrario, si el RE intacto se comporta como un sumidero de Ca^{2+} , entonces la aplicación del fármaco debería facilitar la secreción. Ambos efectos serían reversibles después del lavado del CPA.

La intervención funcional del RE con CPA se realizó teniendo en mente que en estudios previos en el laboratorio se ha demostrado que una contribución más robusta del mecanismo de CICR explica, en parte, la hipersecreción de CAs que se presenta en CCs de ratas SHR cuando se comparan con su contraparte en las ratas WKY [104]. Con base en esta evidencia se supuso

inicialmente que en CCs de ratas SHR, donde la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares es robusta, el CPA debería *inhibir* la exocitosis de CAs (como sucede en CCs de bovino [91]). Por el contrario, en CCs de ratas WKY, donde la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares es débil, el CPA debería afectar menos las respuestas amperométricas (como en CCs de ratón [91]). No obstante, los resultados de este estudio demuestran que el CPA disminuye drásticamente la generación de espigas amperométricas en las CCs de *ambas* cepas de rata (figura 15A y 15B). El efecto del CPA comienza rápidamente y persiste mientras el CPA está presente. Al retirar el CPA se restituyen las características de las descargas amperométricas. Esta recuperación de la respuesta amperométrica luego del tratamiento con CPA es mayor en número de espigas y carga acumulada que en los registros control ante el mismo estímulo (compare las respuestas a los estímulos 6 a 8 en las figuras 14C y 14D con 15C y 15D), probablemente porque durante la aplicación de CPA los estímulos causaron un vaciamiento poco efectivo del PLL, de forma que al retirar el fármaco y permitir el relleno de Ca^{2+} del RE, estímulos subsecuentes (6 a 8) condujeron a la liberación de los gránulos del PLL que no se habían secretado durante el tratamiento farmacológico. La magnitud de la recuperación de las respuestas amperométricas después de lavar el CPA es igual en CCs de ratas WKY y SHR. Nuestra observación de que el bloqueo de la liberación de Ca^{2+} del RE no tiene efectos diferenciales sobre la secreción estimulada de CAs de CCs WKY y SHR es contraria a los resultados previos obtenidos por Segura—Chama [104] y Peña del Castillo et al. [118] pero concuerdan con aquellos presentados por Miranda—Ferreira et al., quienes en una segunda publicación [145] encuentran que la entrada y redistribución del Ca^{2+} hacia el RE y las mitocondrias en las CCs no serían los responsables del fenotipo hipersecretor de las CCs de SHR. Segura—Chama [104] y Peña del Castillo et al. [118] reportan que los $t\text{—}[\text{Ca}^{2+}]$ inducidos por despolarización en CCs de ratas SHR tienen mayor amplitud que los $t\text{—}[\text{Ca}^{2+}]$ de las CCs de ratas WKY, contrariamente a la hipótesis que se propuso aquí previamente. Una diferencia fundamental en la manera como se estimularon las CCs en esos estudios respecto del nuestro es que su pulso despolarizante tiene una duración de 5 s mientras que en este estudio el pulso demora tan solo 1 s. La diferencia no es trivial. Hernández—Guijo et al. [164] reportaron que los CaVs tipo L, P/Q y N en CCs pueden ser inactivados por el Ca^{2+} . Los CaVs tipo L tienen poca inactivación, con valores de tau de $\tau \approx 500$ ms, lo que supone que se inactivarían completamente en ≈ 3 s. De las investigaciones de Segura —Chama [104] y de Peña del Castillo et al. [118] no es posible descartar que los $t\text{—}[\text{Ca}^{2+}]$ más robustos en CCs de SHR se deban, por ejemplo, a diferencias en la velocidad de inactivación inducidas por el Ca^{2+} entrante. Si los CaVs de CCs de SHR se inactivan por Ca^{2+} a una velocidad menor que en las CCs de WKY entonces los $t\text{—}[\text{Ca}^{2+}]$ resultantes de un estímulo despolarizante en las primeras sería mayor que en las segundas. Las consecuencias de un estímulo despolarizante tan duradero sobre la inhibición de la corriente de Ca^{2+} son aún más dramáticas si se tiene en cuenta que los CaVs tipo L, que son la mayoría en CCs de rata (figura 9) [65] [70], resienten más la

inactivación por Ca^{2+} que otras isoformas de CaVs [164] [171] [209]. El impacto del aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sobre la inactivación de los CaVs en CCs de ratas SHR y WKY es un tema aún por profundizar. Por otra parte, el estímulo despolarizante con alto K^+ causa en las CCs disparos de potenciales de acción que finalmente conducen a la entrada de Ca^{2+} a la célula. En este contexto, Peña del Castillo et al. [118] y Segura—Chama [104] tampoco descartan que durante su estímulo prolongado (5 s) haya diferencias acumulativas en los parámetros de los potenciales de acción en las CCs de una cepa de rata y otra. Booksby et al. [165] reporta, por ejemplo, que los cardiomiocitos ventriculares de ratas SHR presentan más fuerza de contracción debido a una señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ más robusta que en su contraparte las ratas WKY. El mecanismo detrás de esta diferencia es que el potencial de acción de los cardiomiocitos de SHR tienen una mayor duración que los de ratas WKY. Es probable que la mayor amplitud de los $t-[\text{Ca}^{2+}]$ de CCs de SHR que observa Peña del Castillo et al. y Segura—Chama et al. se deban a este fenómeno aún sin estudiar. Finalmente, en estas dos investigaciones se aduce que los $t-[\text{Ca}^{2+}]$ más robustos en las CCs de ratas SHR se deben a que se presenta mayor liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares sensibles a cafeína (el RE). No obstante, como reporta Thayer et al. [158] para neuronas simpáticas de rata, la existencia de un depósito sensible a cafeína no se traduce necesariamente en un mecanismo CICR funcional y activo que responda a un estímulo mediante la contribución a la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs.

Hay un aspecto que vale la pena considerar respecto a los estudios de Segura—Chama et al. [104] y Peña del Castillo et al. [118]. Toda la evidencia que apoya una mayor CICR en las CCs de SHR respecto de las CCs de WKY se basa en resultados obtenidos en células aisladas en cultivo y después de un solo estímulo. Esa situación especial (con los reservorios llenos de Ca^{2+} y la célula en reposo, sin influencias paracrina o sináptica) no necesariamente representa la situación en la que encuentran las CCs en el tejido la mayor parte del tiempo. Un hallazgo importante de nuestra investigación es que, durante la estimulación eléctrica repetitiva, la diferencia entre SHW y WKY, en términos de la secreción de catecolaminas cae drásticamente después de unos cuantos estímulos. La mayor secreción de catecolaminas en las CCs de SHR versus las CCs de WKY, evaluada a partir de la respuesta a un solo estímulo, arroja un valor sobreestimado de la ganancia del mecanismo de CICR.

En una tercera publicación de la trilogía de Miranda—Ferreira et al. [146] encuentran que, en la preparación de rebanada de glándula adrenal, las mitocondrias de CCs de SHR captan y liberan más $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras un estímulo despolarizante respecto a su particular control normotenso, las CCs de las ratas Sprague—Dawley. Es curioso que el fenotipo hipersecretor de CAs esté precedido por una exacerbada señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por despolarización —*in situ*— cuando las CCs están en contacto unas con otras en la rebanada, pero que dicha señal intensificada desaparezca cuando las CCs están dissociadas en cultivo. El grupo de investigación

de Guérineau ha reportado que las uniones estrechas entre las CCs en el tejido adrenomedular facilitan las señales de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de CAs entre las células pertenecientes a un determinado clúster [147] [148] [149], probablemente por la considerable plasticidad morfológica y funcional que se presentan en estas estructuras en función de distintos estresores [163]. Si las uniones estrechas entre las CCs de ratas SHR en una rebanada robustecen la exocitosis de CAs más que en CCs de WKY, con la intermediación de una señal de $[Ca^{2+}]_i$ facilitada, entonces se podría explicar por qué no observamos efectos diferenciales del CPA sobre la exocitosis de CAs en CCs disociadas de estas dos cepas de rata. La modulación de la exocitosis de CAs y las señales de $[Ca^{2+}]_i$ por las uniones estrechas en CCs de rebanadas de glándula adrenal de ratas SHR y WKY podría ser evaluada en futuros experimentos. En cualquier caso, disociadas en cultivo o *in situ* en la rebanada, las CCs de SHR liberan más CAs tras un estímulo que las CCs de WKY o de ratas Sprague—Dawley. El estudio de las CCs disociadas en cultivo (cuando se aplica un estímulo breve, por ejemplo, 1 s) ofrecen una oportunidad única de medir el fenotipo hipersecretor sin que haya una señal de $[Ca^{2+}]_i$ exacerbada que “contamine” la observación. Además, sugiere fuertemente que una señal prominente de $[Ca^{2+}]_i$ no es la única causa que explica la hipersecreción de CAs en las CCs de SHR y que, muy probablemente, un mayor número de GCCs con más contenido de CAs también estaría implicado en el fenotipo hipersecretor en estas células. De manera correspondiente, Peña del Castillo et al. [118] muestra que las CCs de ratas SHR presentan el doble de GCCs por μ^2 de superficie citoplasmática respecto a las CCs de WKY, lo que haría más probable la liberación estimulada de CAs en las CCs de SHR aunque las señales de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por despolarización fueran de la misma magnitud que en las CCs de WKY.

Una explicación alternativa al porqué el CPA afecta de manera similar la exocitosis de CAs de las CCs de ambas cepas de ratas es que en las WKY haya mecanismos de movilización de $[Ca^{2+}]_i$ adicionales que estarían promoviendo que el efecto del CPA en estas células no fuera el de *facilitar* la exocitosis, como ocurre en CCs de ratón [91]. Por ejemplo, una mayor capacidad de captura del Ca^{2+} que entra a la célula por parte de las mitocondrias, como ya se ha reportado en CCs de bovino [67] [80] [85], contribuiría a una menor cantidad de Ca^{2+} disponible en el citosol para la maquinaria secretora en estas células. Esto le permitiría a una célula estimulada liberar menos CAs, aun cuando la *fuerte* actividad de captura de Ca^{2+} del RE en CCs de rata WKY esté siendo bloqueada por CPA. No obstante, se ha reportado que la magnitud de la captura de Ca^{2+} por las mitocondrias es de hecho mayor en las CCs de ratas SHR [146], así que esta alternativa no parece un escenario probable.

Esta investigación nos llevó a interesarnos en la fisiología comparada de CCs de distintas especies de mamíferos de interés. Uno de los objetivos del presente estudio fue establecer si el papel principal del RE de las CCs de rata es *facilitar* o *inhibir* la exocitosis de

CAs. La inquietud resulta del hecho de que en CCs de otras especies de mamíferos se han encontrado respuestas secretoras diametralmente opuestas después de intervenir la acción de transporte de Ca^{2+} del RE. Por ejemplo, en CCs de ratón (CCM), Rigual et al. [116] reportan que la aplicación de CPA facilita la exocitosis de CAs inducida por despolarización con alto K^+ . En las mismas células, Martínez—Ramírez et al. [91] observa que el CPA potencia de manera reversible la liberación de CAs inducida por acetilcolina. En contraste, la aplicación de CPA deprime la exocitosis de CAs en CCs de bovino (CCB) [91]. En ese contexto, nos preguntamos cómo afecta el CPA la exocitosis de CAs en CCs de rata. Mediante un paradigma experimental parecido al empleado por Martínez—Ramírez et al. [91] observamos que la aplicación de CPA inhibe significativamente la secreción de CAs en CCs de rata (figura 15). **En experimentos complementarios, encontramos que el CPA deprime la liberación de CAs en las CCBs registradas bajo nuestras condiciones experimentales (figura 20A), corroborando así las observaciones** de Martínez—Ramírez et al. [91]. Desde el punto de vista de la fisiología comparativa, que el RE de las CCs de rata se comporte ante un estímulo de manera similar a las CCBs y diferente a las CCMs es un hallazgo inesperado pues esperábamos que, al tener una distancia filogenética menor, las CCs de rata y ratón se comportarían de manera similar y diferente a las CCs de bovino. Entonces, a pesar de que la distancia filogenética con el ancestro común más cercano de ratas y ratones es menor (10.3 millones de años) que la distancia filogenética del ancestro común de ratas y bovinos (94 millones de años) [123], el efecto de aplicar y retirar el CPA sobre la liberación de CAs en las CCs de rata es parecido al efecto que tiene este fármaco en las CCs de bovino y diametralmente opuesto a su efecto en las CCs de ratón [91] [92], una especie más cercana desde el punto de vista evolutivo.

Teniendo en cuenta los resultados hasta este punto del estudio se pueden formular dos conclusiones:

1. La aplicación de CPA inhibe fuertemente la exocitosis de CAs en CCs tanto de ratas WKY como SHR.
2. La inhibición reversible de la bomba de Ca^{2+} del RE (SERCA) afecta la exocitosis de CAs en CCs de rata de manera *similar* a las CCs de bovino y de manera *opuesta* a las CCs de ratón, a pesar de la gran distancia filogenética que hay entre ratas y bovinos en comparación con la distancia que hay entre ratas y ratones.

Registros de señales de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización repetitiva en CCs de ratas SHR y WKY bajo condiciones control

Un resultado intrigante del reporte de Martínez—Ramírez et al. [92] es que, si bien la exocitosis estimulada por ACh es inhibida significativamente durante la aplicación de CPA en CCs de bovino, las señales de Ca^{2+} bajo las mismas condiciones experimentales disminuyeron tan solo un poco, tanto en CCs de bovino como de ratón [91]. Esta discrepancia entre la amperometría y las señales de Ca^{2+} al evaluar el efecto del CPA, puede deberse al indicador sensible a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que utilizaron. Fura—2 es un indicador fluorescente selectivo a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con una alta afinidad (220 nM), lo que lleva a que se sature a bajas concentraciones micromolares del ión. Además, se ha reportado que interfiere con la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ antagonizando el mecanismo de CICR [124]. Para evitar las complicaciones del Fura—2 y llevar a cabo los experimentos de imagenología de Ca^{2+} , empleamos el indicador fluorescente de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Fluo—4. Este indicador tiene una menor afinidad por el Ca^{2+} (≈ 350 nM), por lo que puede medir concentraciones más elevadas del ion sin saturarse. Además, no está reportado que Fluo—4 interfiera con el mecanismo de CICR.

Como se demuestra en las figuras 16A y B, los transitorios de Ca^{2+} ($t-[\text{Ca}^{2+}]$) en respuesta a una serie de pulsos despolarizantes con alto K^+ de 1 s en duración y 30 s de intervalo van disminuyendo su amplitud de manera paulatina pero no drásticamente. Este pequeño pero persistente descenso de la movilización de Ca^{2+} probablemente se deba a un efecto aditivo de la inactivación de CaVs [164] pues no se aprecia ninguna acumulación intracelular remanente del ión. Sin embargo, la pregunta que queda sin resolver es: ¿por qué si el $t-[\text{Ca}^{2+}]$ generado por el 2do estímulo es casi idéntico al producido por el 1ro, la respuesta amperométrica decae abruptamente entre estos dos estímulos? Una posibilidad es que el 1er estímulo reduzca severamente el *pool* de gránulos listo para liberar (PLL) haciendo que, ante estímulos subsecuentes, las respuestas amperométricas sean progresivamente más pequeñas [122]. El decaimiento en la exocitosis con la estimulación repetitiva corrobora lo reportado por Augustine & Neher [152] y Heinemann et al. [176] en CCBs quienes observan una disminución evidente en la fusión de GCCs a la membrana plasmática a pesar de la persistencia de una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ alta, por lo que proponen también que la depresión en la secreción ante despolarizaciones recurrentes sería producto del vaciamiento del PLL. Nótese que el decaimiento en función de los estímulos aplicados es más notorio en las CCs de SHR dado que ante el estímulo inicial secretan más CAs (figura 15), lo que refuerza la hipótesis discutida anteriormente sobre un PLL más prominente en estas células respecto a las CCs de WKY [104] [144] [146].

Si bien el decaimiento de la exocitosis con despolarizaciones recurrentes es más abrupto en las CCs de SHR, la respuesta amperométrica decae notoriamente también en las CCs de WKY. La importancia fisiológica del decaimiento abrupto de la exocitosis ante la estimulación repetitiva tendría que ver con el tipo de molécula que se está liberando. A diferencia de células como los neutrófilos o las células mastocíticas, que presentan una liberación masiva del contenido hormonal y proteico en su proceso de degranulación, la exocitosis de CAs desde las CCs debe ser estrictamente regulada pues a concentraciones plasmáticas de 1 μM está reportado que estas moléculas causan daños irreversibles al organismo como la falla cardíaca, el edema pulmonar o el coma por picos de hipertensión arterial. Dicha concentración de CAs en sangre (1 μM) se puede alcanzar si tan solo el 5% de todos los GCCs son liberados [150]. Se han descrito mecanismos protectores que podrían promover el decaimiento de la exocitosis luego del vaciamiento del PLL ante un estímulo inicial, como la existencia de una barrera citoesquelética para limitar el acceso de los gránulos a los sitios de liberación [151] [186]; proteínas de unión a GTP, que controlan la unión del gránulo al citoesqueleto para su movilización; y anexinas, que interactúan con fosfolípidos en la membrana plasmática para bloquear el acceso de los GCCs a sitios de fusión potenciales [150]. Dichos mecanismos actuarían en etapas tempranas del proceso de exocitosis, esto es, durante el tráfico de gránulos desde regiones adentro de la célula hacia el subplasmalema para después entrar en el proceso de maduración vesicular y fusión. En estos estudios, Aunis & Langley [150] reportan que estos mecanismos que se oponen a la exocitosis son esencialmente dependientes de Ca^{2+} . Por otra parte, ha sido bien caracterizado por E. Neher y colaboradores que, en estas etapas tempranas de la exocitosis, que implican la movilización de GCCs para surtir el desgastado PLL y el *pool* de gránulos de reserva (PR) luego de un estímulo inicial, también hay dependencia de Ca^{2+} para que dichos movimientos ocurran [121] [153] [154] [155] [176]. Así, es posible proponer una explicación razonable sobre el porqué ante estímulos despolarizantes repetitivos decae la exocitosis de CAs pero se mantiene intacta la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$: la exocitosis decae porque el primer estímulo vacía una fracción considerable del PLL y los estímulos subsecuentes demoran en reabastecerlo. Esta demora se debe a mecanismos dependientes de Ca^{2+} que en el proceso de secreción temprano implican el transporte de nuevos GCCs hacia el subplasmalema a la vez que dificultan espacialmente el acceso de estos a sitios de liberación, pues de persistir los mismos niveles de secreción en un tiempo tan corto causaría daños irreversibles al organismo [150] [151]. Por su parte, la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantiene inalterada pues garantiza dos cosas: la primera es que al favorecer el tráfico vesicular [153] [154] [155] [176], la secreción —aunque disminuida— no se detiene y permite así satisfacer las demandas del organismo si los estímulos continúan llegando y, a la vez, la misma señal de Ca^{2+} gatilla la acción de proteínas del citoesqueleto [151] que una vez activadas desencadenan un mecanismo de protección que impiden físicamente el acceso de muchos GCCs nuevos a los sitios de liberación evitando así exceder concentraciones plasmáticas de

CAs que comprometan la supervivencia. De esta forma se garantiza que la respuesta secretora se mantenga (aunque disminuida) ante estímulos repetitivos sin que el estrés estimulador de la médula adrenal conduzca al envenenamiento del organismo.

La dinámica de los $t-[Ca^{2+}]_i$ inducidos por pulsos de alto K^+ de 1 s en duración y aplicados a intervalos de 30 s poseen características que se habían pasado por alto en estudios anteriores: la mayoría de CCs presentan $t-[Ca^{2+}]_i$ con un solo componente que sube rápidamente y decae de inmediato (figuras 16A y B). En algunas otras células, los $t-[Ca^{2+}]_i$ tienen una fase de decaimiento más lenta que puede presentar pequeños abultamientos o protuberancias que indicarían flujos de Ca^{2+} demorados en respuesta al estímulo. Finalmente, en una baja proporción de CCs, se dieron $t-[Ca^{2+}]_i$ con un componente temprano rápido seguido de un componente tardío más lento (figuras 16C y D).

Efecto de la aplicación de CPA y rianodina sobre los $t-[Ca^{2+}]_i$ en CCs de ratas SHR y WKY

Empleando el indicador fluorescente de Ca^{2+} Fura-2, Martínez-Ramírez et al. [91] reporta una pobre correspondencia entre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs subyacente en CCBs y CCMs. Este hallazgo es sorprendente pues, como reporta E. Neher y colaboradores, el Ca^{2+} es necesario tanto para la fusión del gránulo cromafín (GCC) con la membrana plasmática como para eventos tempranos de la exocitosis como la movilización de GCCs desde regiones adentro de la célula hacia el subplasmalema [59] [122] [154] [155] [176]. En este trabajo utilizamos el indicador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4 que, a diferencia de Fura-2 [124], no tiene reportes de interferencia con el mecanismo CICR. Mediante estas modificaciones experimentales nosotros encontramos una fuerte correspondencia entre la exocitosis y la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por despolarización tanto en CCs de rata (compare figura 15 con figuras 18 y 19) como en CCB (figura 20). Nuestros datos corroboran lo reportado por Agustine & Neher [152] en CCBs quienes midiendo simultáneamente cambios en la capacitancia y señales de $[Ca^{2+}]_i$ hallan correspondencia directa entre ambos fenómenos. Asimismo, observando ambos procesos en simultáneo mediante amperometría y señales fluorescentes de $[Ca^{2+}]_i$ en CCBs (Finnegan & Wightman [177]) y en CCs de rata (Finnegan et al. [142]) se observa también una fuerte correspondencia entre elevaciones en la $[Ca^{2+}]_i$ y la aparición de espigas amperométricas al aplicar pulsos de alto K^+ y otros secretagogos. La falta de correspondencia entre las señales de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de CAs del estudio de Martínez-Ramírez et al. [91] pareciera ser un efecto del uso de Fura-2 como indicador de Ca^{2+} . Aquí demostramos que el indicador fluorescente de Ca^{2+} Fluo-4 es una buena opción para

observar variaciones relativas de la $[Ca^{2+}]_i$ en correspondencia con medidas amperométricas de liberación de CAs ante estímulos de alto K^+ o tratamientos farmacológicos con CPA y Ry.

Encontramos que en las CCs de rata con un $t-[Ca^{2+}]$ de un solo componente, la aplicación de CPA reduce significativamente tanto el ancho de la onda al 50% de la carga (HW) como el área normalizada bajo la curva (NA) (figura 19). En CCs con $t-[Ca^{2+}]$ más anchos o en aquellas con $t-[Ca^{2+}]$ con los componentes temprano rápido y tardío lento, el CPA reduce su duración o elimina el componente tardío si está presente, respectivamente. Después de retirar el CPA, el $t-[Ca^{2+}]$ recobra su anchura o reaparece el componente tardío, según sea el caso. La interpretación de estos resultados es relativamente sencilla: la inhibición de SERCA por el CPA produce un vaciamiento parcial de RE que, en consecuencia, reduce la liberación de Ca^{2+} . Esto conduce a una disminución de la *ganancia* del mecanismo de CICR del RE y la consecuente atenuación de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ generada por despolarización. El hecho de que la aplicación del CPA lleve a la desaparición del componente tardío del $t-[Ca^{2+}]$ cuando está presente permite proponer, razonablemente, que se trata de *la amplificación de la señal de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares por medio del mecanismo de CICR*. Esto supone que el componente temprano se debe principalmente a la contribución de la entrada de Ca^{2+} a través de los CaVs, pues es menos inhibido por el CPA y no se tiene reportes de que el fármaco tenga algún efecto directo sobre ellos. No obstante, no se descarta que una parte menor del componente temprano rápido se deba a la contribución del mecanismo de CICR.

La aparente diferenciación del $t-[Ca^{2+}]$ inducido por despolarización de un componente temprano que representa la entrada de Ca^{2+} a la célula y un componente tardío que sugestivamente se trata del mecanismo de CICR constituye un hallazgo sin precedentes. Decidimos entonces hacer experimentos adicionales con el fin de detallar mejor los dos componentes de los $t-[Ca^{2+}]$ inducidos por voltaje que se presentaban en algunas pocas CCs de rata. Como se observa en la figura 21A una breve exposición a Ry (10 μ M) en las CCs de rata produce la desaparición del componente tardío de los $t-[Ca^{2+}]$ inducidos por despolarización dejando menos afectado el componente temprano. Con base en estudios previos de Hernández—Cruz et al. [125] que muestran que el BAPTA—AM interfiere con la liberación intracelular de Ca^{2+} por el mecanismo de CICR, expusimos las CCs de rata a este quelante rápido de Ca^{2+} (10 μ M) durante 10 min y observamos la desaparición del componente tardío lento sin que afectara significativamente al componente temprano rápido del $t-[Ca^{2+}]$ (dato no mostrado). Finalmente hicimos el experimento recíproco, es decir, promover la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares con cafeína (10 mM) en lugar de provocar su entrada desde el exterior con despolarización, y observamos que la cinética de la señal de Ca^{2+} resultante es muy parecida a la del componente tardío de los $t-[Ca^{2+}]$ inducidos por despolarización con alto K^+ (figuras 21B a C). La señal de Ca^{2+} inducida con cafeína ocurre con una demora

característica ya reportada previamente por Segura—Chama et al. [104], aunque su cinética de subida es más rápida que la del componente tardío de la señal generada por el estímulo despolarizante (compárese los trazos de la primera derivada de la figura 21C). La predominante inhibición del segundo componente de los $t-[Ca^{2+}]_i$ por Ry (figura 21A) y CPA (figura 18B) (dos fármacos que afectan la respuesta al Ca^{2+} del RE mediante diferentes mecanismos de acción), refuerza la idea de que *el componente tardío corresponde principalmente a la contribución de la liberación intracelular de Ca^{2+} regulada por el mecanismo de CICR*. En conjunto, estos datos sugieren que el componente temprano rápido y el componente tardío lento de la señal de Ca^{2+} disparadas por despolarización con alto K^+ representan dos fenómenos celulares distintos: la entrada de Ca^{2+} a través de los CaVs y la liberación intracelular de Ca^{2+} por el mecanismo de CICR, respectivamente.

Observar en la dinámica de una señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por despolarización los componentes mecánicos que la conforman (entrada de Ca^{2+} , captación y liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, extrusión del ión al espacio extracelular, etc.) ha sido tema de estudio por décadas. Por ejemplo, en los trabajos clásicos de Lipscombe et al. [156], Friel & Tsien [87] y Hua et al. [161] en neuronas simpáticas de sapo, y Llano et al. [162] en células de Purkinje de rata, encuentran que el fenómeno de CICR participa principalmente durante la fase de subida inicial del $t-[Ca^{2+}]_i$ inducido por voltaje. De igual forma, en su estudio, Alonso et al. [115] muestran que en CCB la rianodina disminuye la amplitud y la velocidad de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el subplasmalema y en regiones cercanas al núcleo. En este aspecto nuestros hallazgos corroboran las observaciones hechas en estos estudios previos. Como se observa en la figura 24C la velocidad de subida del $t-[Ca^{2+}]_i$ generado por despolarización disminuye considerablemente durante el tratamiento con CPA (compare 24Ca2 con 24Cb2), por lo que una contribución del mecanismo de CICR durante la fase de subida del primer componente rápido del $t-[Ca^{2+}]_i$ que observamos en CCs de rata no se descarta. No obstante, nuestros experimentos sugieren que la mayor contribución del RE en la movilización de Ca^{2+} por el mecanismo de CICR parece darse durante la aparición del segundo componente del $t-[Ca^{2+}]_i$, más lento y sensible a CPA (figura 18B), rianodina (figura 21B) y cafeína (figura 21B). No son muchos los ejemplos de $t-[Ca^{2+}]_i$ inducidos por despolarización con una cinética que permita diferenciar dos componentes con velocidades de subida diferentes y claramente discernibles en el tiempo como los que observamos en esta investigación (figuras 18B y 21A). $t-[Ca^{2+}]_i$ inducidos por despolarización con cinéticas complejas se presentan en neuronas sensoriales, simpáticas y centrales de rata, como reporta Thayer et al. [157]. Aunque en neuronas simpáticas de rata la cinética compleja del $t-[Ca^{2+}]_i$ no presenta una contribución significativa del mecanismo de CICR [158], el mismo Thayer et al. [159] reporta que en neuronas sensoriales de la misma especie dicho mecanismo está activo y es discernible de sus registros de señales fluorescentes de $[Ca^{2+}]_i$. Estos $t-[Ca^{2+}]_i$ de neuronas sensoriales tienen una fase de subida

rápida seguida de un descenso inicialmente rápido que luego cesa para dar lugar a una fase de meseta característica hasta que la $[Ca^{2+}]_i$ llega a sus valores de reposo después de varios segundos. Thayer et al. [159] propone que la primera fase rápida del decaimiento del $t-[Ca^{2+}]_i$ se debe a la acción de algún depósito de Ca^{2+} intracelular vacante que rápidamente captura el Ca^{2+} libre en el citosol y que, una vez lleno el depósito, éste comienza a funcionar como una fuente de Ca^{2+} que junto a la acción extrusora de Ca^{2+} de la bomba de Ca^{2+} de la MP explicarían la fase de meseta que le sigue [159]. Aunque estos $t-[Ca^{2+}]_i$ de neuronas sensoriales no presentan dos fases de subida como los $t-[Ca^{2+}]_i$ que registramos en CCs de rata (una fase temprana de subida rápida seguida de una fase tardía de subida lenta) (figuras 18B y 21A), el ensanchamiento del $t-[Ca^{2+}]_i$ que se da en estas neuronas es explicado por la acción del mecanismo de CICR de una manera similar a la hipótesis que proponemos para explicar la aparición del componente tardío de subida lenta que es responsable del ensanchamiento que observamos en los $t-[Ca^{2+}]_i$ inducidos por voltaje de las CCs de rata en este estudio.

Reportes de señales de $[Ca^{2+}]_i$ con cinéticas que describen dos fases de subida en el mismo transitorio, similares a las reportadas aquí cuando aplicamos un estímulo despolarizante, se han descrito en otros modelos celulares no neuronales aplicando fármacos para liberar Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Monck et al. [189] encuentran que hormonas como la vasopresina induce señales de $[Ca^{2+}]_i$ con dos picos en hepatocitos, no obstante, la secuencia cinética es invertida a la que nosotros encontramos: ellos concluyen que el primer pico se debe a la liberación de Ca^{2+} desde el depósito intracelular mientras que el segundo componente, que desaparece en presencia de EGTA en el medio extracelular, se debe a la entrada de Ca^{2+} a la célula [190] [191]. Asimismo, Millard et al. [188] han encontrado $t-[Ca^{2+}]_i$ con dos componentes de incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en mastocitos cancerígenos con una secuencia de eventos similar. Un resultado parecido al de la acción hormonal sobre las señales de Ca^{2+} en hepatocitos se ha observado en células GH3 de la glándula pituitaria de rata por acción de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH). En su estudio, Albert & Tashjian [192] describen la acción bifásica que tiene la TRH sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ que consiste básicamente en un pico inicial de $[Ca^{2+}]_i$ dado por la liberación intracelular del ión seguido de una fase de plato que es sensible a nifedipina, por lo que estaría involucrado —al menos en parte— un canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L. Como se deduce de sus resultados, en este ejemplo la secuencia de movilización de Ca^{2+} es invertida a la que nosotros observamos en CCs de rata: un primer componente rápido causado por la liberación de Ca^{2+} desde algún depósito intracelular seguido de la entrada sostenida de Ca^{2+} a la célula (plato) desde el medio extracelular. Notablemente, ellos encuentran que la señal de $[Ca^{2+}]_i$ bifásica conduce a una fase inicial de secreción en ráfaga, que ocurre en segundos, seguida de una fase de exocitosis intensificada y sostenida que puede prolongarse durante minutos. Aunque en estos ejemplos las señales de $[Ca^{2+}]_i$ bifásicas se presentan con una secuencia de eventos opuesta a la que se

deriva de nuestras observaciones, está claro que, tras determinados estímulos, las células pueden movilizar Ca^{2+} libre en el citosol desde diferentes fuentes y en diferente orden secuencial. En así cómo, en contraste con estos estudios, encontramos una señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bifásica que, al ser inducida por despolarización y luego ser sensible a CPA, Ry y cafeína, se presenta como una secuencia de eventos que demarcan la entrada inicial de Ca^{2+} a la célula a través de los CaVs seguida de la liberación de Ca^{2+} desde el RE. Ambos procesos contribuyen tanto a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como a la exocitosis de CAs en CCs de rata.

Quizá los $t-[\text{Ca}^{2+}]$ que tienen una cinética con dos componentes de incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, como los que observamos en este estudio con tan solo un estímulo despolarizante, se ha podido reproducir en protocolos de estimulación en los que se aplica un pulso de alto K^+ seguido de la aplicación fármacos como cafeína, en cuyo caso se genera un $t-[\text{Ca}^{2+}]$ “artificial” de un componente temprano con una subida rápida seguido de un componente tardío con una subida lenta. $t-[\text{Ca}^{2+}]$ con estas características cinéticas han sido reproducidos por Hernández—Cruz et al. [160]. En su estudio, Hernández—Cruz et al. [160] condiciona la respuesta de neuronas simpáticas de rata a la aplicación de cafeína aplicando un pulso inicial de alto K^+ a intervalos de 1.5 s. El resultado es un $t-[\text{Ca}^{2+}]$ con un componente temprano rápido que delata la apertura de los CaVs seguido de un componente tardío más lento que describe la liberación de Ca^{2+} a través de los RyR. El reporte de Hernández—Cruz et al. [160] es notable en nuestro contexto pues haciendo dos maniobras diferentes (alto K^+ + cafeína) reproduce un $t-[\text{Ca}^{2+}]$ cuya cinética es casi idéntica a la que obtenemos en este estudio aplicando un estímulo único de alto K^+ , lo que constituye un argumento en favor de la hipótesis de que el componente temprano y tardío representan dos fenómenos diferentes: la entrada —predominante— de Ca^{2+} a la célula a través de los CaVs seguida de la liberación de Ca^{2+} por el RE a través de los RyRs, con una sutil diferencia: nosotros observamos el mecanismo de CICR disparado únicamente por la entrada de Ca^{2+} a la célula tras estimularla, no lo inducimos farmacológicamente con cafeína.

¿Qué sucede con los $t-[\text{Ca}^{2+}]$ únicos, que presentan una sola fase de subida seguida de un decaimiento lento? Como se discutirá más adelante, suponemos que dichos $t-[\text{Ca}^{2+}]$ en realidad están compuestos por un componente que indica la entrada de Ca^{2+} a la célula y otro que, luego de una latencia muy corta, representa la liberación del ión desde depósitos de Ca^{2+} sensibles a CPA y Ry (RE).

En referencia a un impacto diferencial del CPA sobre los $t-[\text{Ca}^{2+}]$ en CCs de ratas SHR respecto a CCs de ratas WKY, los resultados muestran que el fármaco efectivamente reduce tanto el HW como el NA en *ambas* cepas de rata (figura 19). Estos datos concuerdan con la observación de que el CPA reduce la exocitosis de CAs en las CCs de ambos grupos (figura 15).

Sin embargo, la reducción en el HW y el NA por el CPA fue significativamente mayor en las CCs de ratas SHR que en su contraparte WKY (figuras S2 y S3), lo que sugiere un mecanismo de CICR más eficiente (con mayor ganancia) en las CCs de SHR que en las CCs de WKY. No obstante, esta diferencia no tiene implicaciones ni en la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ ni sobre la secreción de CAs. Surge entonces la pregunta: ¿por qué se observa un mecanismo de CICR más eficiente en las CCs de ratas SHR que en las CCs de WKY, pero no se observan diferencias en la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por despolarización? La explicación más sencilla para esta observación es que las CCs de WKY estén compensando la menor ganancia del mecanismo de CICR con la movilización de Ca^{2+} desde otras fuentes que pudieran remediar ese déficit y hacer que la señal global de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por despolarización sea igual a las de las CCs de SHR. Diferencias en la carga de Ca^{2+} que entra a la célula tras un pulso de voltaje está descartada pues, como demuestra Segura—Chama et al. [114], no existen diferencias en la magnitud ni en la inactivación dependiente de voltaje de la corriente de Ca^{2+} entre CCs de ratas SHR y WKY. Una opción podría residir en la función mitocondrial. Las mitocondrias tienen la capacidad de amortiguar altas cantidades de Ca^{2+} tanto en CCs de rata [79] [168] [169] como en CCBs [67] [80] [166] [167]. Miranda—Ferreira et al. [146] reporta que las mitocondrias de las CCs *in-situ* en la rebanada de glándula adrenal de SHR presentan transitorios de Ca^{2+} mitocondrial de mayor amplitud tras un estímulo despolarizante que en el grupo control que emplearon, las ratas Sprague—Dawley. Si las mismas diferencias en la función mitocondrial se repiten al hacer la comparación con las CCs de ratas WKY, entonces es posible proponer una hipótesis razonable para dar respuesta a la pregunta planteada: si la misma cantidad de Ca^{2+} entra a la célula tras un estímulo despolarizante [114] pero las mitocondrias de las CCs de WKY presentan menor capacidad de captación de Ca^{2+} que en las CCs de SHR [146], entonces habrá mayor disponibilidad de Ca^{2+} en el citosol de las CCs de WKY que en el citosol de CCs de SHR, lo que compensaría en estas células la menor ganancia del mecanismo de CICR haciendo que el balance final fuera la misma señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por voltaje en ambos grupos. En síntesis, las CCs de SHR presentan un mecanismo de CICR más fuerte que las CCs de WKY, pero tienen la misma señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por despolarización probablemente porque las mitocondrias de las primeras tienen mayor capacidad de secuestrar el Ca^{2+} entrante que las segundas, lo que llevaría a un balance equitativo en la movilización de Ca^{2+} citosólico en las CCs de ambos grupos. Es una hipótesis que puede ser evaluada directamente en futuras investigaciones observando el efecto que sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ estimulada tiene el bloqueo de la movilización de Ca^{2+} por las mitocondrias en CCs de ambas cepas de rata.

El efecto del CPA sobre las señales de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis estimulada de CAs tiene implicaciones en el contexto de la fisiología comparada de las CCs en vertebrados: sin importar la subespecie de rata (SHR o WKY) de las que se obtengan las CCs, estos datos muestran que la interrupción reversible de la captación de Ca^{2+} por del RE mediante CPA tiene un efecto

inhibidor de la liberación estimulada de CAs y la movilización de $[Ca^{2+}]_i$. Al replicar el efecto *inhibidor* del CPA sobre la respuesta amperométrica y las señales de Ca^{2+} en CCs de bovino (figura 20), pudimos confirmar los resultados del estudio de Martínez—Ramírez et al. [91], dando así sustento a una de las principales conclusiones del presente estudio: que el CPA afecta la exocitosis de CAs y la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ en CCs de rata de una manera similar a como lo hace en las CCs de bovino y diferente a su efecto en CCs de ratón, a pesar de que el ancestro en común de ratas y bovinos divergió mucho antes que lo hiciera el ancestro común de ratas y ratones [123].

En cuanto a las acciones farmacológicas del CPA y la Ry sobre las CCs de rata falta abordar una última pregunta: ¿qué diferencias hay en sus efectos sobre los $t-[Ca^{2+}]$ desencadenados por cambios en el voltaje? Los efectos de la Ry sobre el HW y el NA de los $t-[Ca^{2+}]$ se resumen en la figura 22. De igual manera, los efectos del CPA sobre los mismos parámetros se resumen en la figura 19. En general, las acciones de ambos fármacos sobre la señal de $[Ca^{2+}]_i$ se parecen, sin embargo, el efecto inhibitor del CPA parece ser más potente: el CPA reduce el HW un 73.1% y un 68.5% en CCs de ratas SHR y WKY, respectivamente; y, en ese mismo orden, disminuye el NA un 84% y un 71%. Por su parte, después de la aplicación de Ry hay una reducción del 63 % en el HW y de un 66% en el NA. después de retirar el CPA, el HW se recupera por completo en las CCs de ambos grupos de ratas (figuras 19A y C) aunque persiste un efecto residual del CPA sobre el NA (figuras 19B y D). De igual manera, los efectos de la Ry sobre el HW se revierten completamente después de su lavado (figura 22A) mientras que el NA se recupera parcialmente (figura 22B). Estas diferencias en la recuperación del HW y el NA después del lavado del CPA podrían deberse al hecho de que el HW sufre pocas alteraciones durante la estimulación repetitiva (figuras 17A y B) mientras que el NA decae gradualmente un 23.9% en CCs de ratas WKY y un 19.2% en CCs de ratas SHR luego de 8 estímulos (figuras 17B y D).

Registro simultáneo de la dinámica de $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs en CCs individuales

La presencia de ráfagas de espigas amperométricas es difícil de identificar a simple vista en los registros pues a la fase rápida de la exocitosis le sigue una fase lenta de frecuencia variable [60] [121] en la que es difícil discernir si lo que se observa es una descarga “tónica” o una descarga en “ráfaga”. Por esta razón se calculó la integral del registro amperométrico. La integral de la corriente en el tiempo da como resultado la carga acumulada, una medida indirecta de la cantidad de moléculas de CAs secretadas en un periodo determinado. Así, para

cada registro amperométrico de 30 s se calculó la acumulación de carga cada 0.5 s (60 particiones) y mediante esta estrategia de análisis fue posible correlacionar la aparición de *ráfagas de espigas* en los registros amperométricos con *incrementos escalonados* de la carga acumulada. Con este abordaje, los registros simultáneos permitieron correlacionar la cinética de los $t-[Ca^{2+}]_i$ con la velocidad de aparición de espigas amperométricas y la carga liberada acumulada en una misma célula. Para este análisis también se calculó la primera derivada de los $t-[Ca^{2+}]_i$ como una manera de evaluar la magnitud de los flujos de Ca^{2+} involucrados. En la figura 23 se resumen los resultados de registros simultáneos de 7 CCs representativas que se estimularon con un pulso despolarizante de alto K^+ de 1 s de duración. Se identificaron tres patrones representativos de señales de Ca^{2+} en CCs de rata. Los $t-[Ca^{2+}]_i$ **tipo 1** (figura 23A1), que se caracterizan por ser estrechos y presentar una fase de subida rápida seguida de una fase de decaimiento lento. Los $t-[Ca^{2+}]_i$ **tipo 2** (figura 23B1, C1, D1), con mayor duración que los primeros y que pueden presentar protuberancias o jorobas en su fase de decaimiento. Finalmente, los $t-[Ca^{2+}]_i$ **tipo 3** (figura 23E1, F1), que están conformados por dos componentes cinéticos distintos: un componente temprano rápido seguido de un componente tardío más lento.

En general, el estudio de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ estimuladas en CCs se hace promediando la respuesta de una población de células o se enfocan solamente en registros representativos [89] [91] [111] [115] [116] [142] [167] [174] y no se tiene en cuenta la diversidad de respuestas de las células individuales. La aplicación de ese tipo de análisis se extiende incluso al estudio de CCs de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR [114] [118] [146]. El hallazgo de poblaciones de CCs con distintas características cinéticas en sus señales de $[Ca^{2+}]_i$ fue llamativo pues algunas presentaban componentes claramente discernibles en escalas temporales de segundos (figura 16C, D). Inclusive dentro de un mismo tipo de respuesta, como los $t-[Ca^{2+}]_i$ tipo 3 que se observan en algunas pocas CCs, hay comportamientos diversos en cuanto a la cinética del componente temprano y el componente tardío de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ estimulada (figura 18B y figura 23E1, F1); lo que develaría la contribución diferencial de los CaVs y la liberación de depósitos intracelulares a la señal de $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de CAs. La observación de señales de $[Ca^{2+}]_i$ con distintas cinéticas en la población de CCs de rata que aquí observamos es consistente con lo reportado por O'Sullivan et al. [175] en CCBs, por lo que es probable que las CCs sean naturalmente una población heterogénea independientemente de la especie animal en la que se estudien. Respecto a las variaciones que se observan en el componente tardío de los $t-[Ca^{2+}]_i$ tipo 3 en distintas CCs (figura 18B y figura 23E1, F1), Finnegan & Wightman [177] reportan que el uso de bradiquinina, sustancia que incrementa la $[IP3]$ en el citosol, produce en CCBs toda una paleta de señales de $[Ca^{2+}]_i$ con diferentes cursos temporales. Si se tiene en cuenta que i) el depósito de Ca^{2+} sensible a $IP3$ es el mismo depósito de Ca^{2+} sensible a cafeína en CCs [115], y que ii) el componente tardío de los $t-[Ca^{2+}]_i$ tipo 3

se debe principalmente a la contribución del depósito de Ca^{2+} sensible a CPA (figura 18B), rianodina (figura 21B) y cafeína (figura 21B), podemos concluir entonces que nuestros datos son consistentes con la amplia variabilidad de respuestas a bradiquinina que reportan Finnegan & Wightman [177]. Una heterogeneidad similar de respuestas celulares ante la estimulación se ha observado en otros modelos celulares como los hepatocitos [189] y algunas líneas cancerígenas de mastocitos [188]. La extensa gama de respuestas cinéticamente diferentes en cuanto a movilización de Ca^{2+} del RE en distintas CCs es interesante. Hipótesis tentativas sobre los mecanismos fisiológicos involucrados en la heterogeneidad de las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimuladas en las CCs de rata, máxime en lo que se refiere al mecanismo de CICR impulsado por el RE ante la despolarización de la membrana, se discutirán más adelante.

Otro aspecto que merece la pena discutir es el de la relación entre la cinética de los $t-[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por despolarización y la velocidad de exocitosis de CAs de las CCs de rata. Nosotros observamos una clara relación directa entre cambios en la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y variaciones en la velocidad de disparo de espigas amperométricas. En palabras de Augustine & Neher [152], delatamos una clara relación dosis—respuesta entre la duración de la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la persistencia y magnitud de la secreción de CAs. Por vías diferentes, los resultados de nuestro análisis empleando la primera derivada de los $t-[\text{Ca}^{2+}]_i$ medidos por fluorimetría y la carga acumulada de CAs secretadas medida por amperometría, en CCs de rata, son consistentes con los resultados derivados del abordaje analítico de Augustine & Neher [152] utilizando curvas X e Y de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ medida también por fluorimetría versus cambios en la capacitancia de la membrana como índice de fusión de gránulos, respectivamente, en CCBs. Esta relación entre la dosis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción de CAs que observamos en nuestro estudio se corrobora también con la investigación de Finnegan & Wightman [177] en CCBs y de Finnegan et al [142] en CCs de rata midiendo fluorimetría de Fura—2 y amperometría simultáneamente en la misma célula. No obstante, la relación directa entre dosis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y exocitosis de CAs no se observa en las mediciones realizadas por Rigual et al. [116] en CCMs, y por Alés et al. [89] y Martínez—Ramírez et al. [91] ambos en CCMs y CCBs. En el caso de Rigual et al. [116] sorprende que el vaciamiento previo del Ca^{2+} del RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$) condicionado por cafeína (5 mM) produzca señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidas por despolarización atenuadas que conducen al aumento en la exocitosis de CAs, lo que supone una relación inversamente proporcional entre la dosis de Ca^{2+} citosólica y la secreción de CAs. Dado que las etapas iniciales de la secreción relacionadas con la movilización de GCCs hacia el subplasmalema y la etapa final de dicho proceso enmarcada en la fusión de dichos gránulos a la membrana plasmática dependen esencialmente de Ca^{2+} [113] [121] [138] [153] [154] [155] [176], de momento no tenemos una explicación para tales observaciones y su divergencia con nuestros resultados.

Dos de los hallazgos más importantes de esta investigación en CCs de rata fueron: i. la observación de la amplia heterogeneidad de respuestas en la movilización de Ca^{2+} citosólico gatilladas por la apertura de los CaVs, y, ii. la demostración de que esa heterogeneidad en la movilización de Ca^{2+} citosólico precede y contribuye, de manera robusta y predecible, a la secreción de CAs. Quizá el ejemplo más sobresaliente de esta relación es el registro simultáneo mostrado en la figura 23G1, G3. Allí se observa que incluso las fases de subida de las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de los dos tercios finales del curso temporal del registro (figura 23G1) contribuyen a la liberación de CAs de la célula (figura 23G3, G4). Otro hecho que se destaca de este trabajo es que el componente tardío lento del $t-[\text{Ca}^{2+}]_i$, sensible a CPA, rianodina y cafeína, contribuye a la exocitosis de CAs sin que sea necesario promover su liberación por medio de fármacos, basta tan sólo con el estímulo despolarizante. Este hallazgo se discutirá en la siguiente sección abajo.

A partir de la amplia heterogeneidad de respuestas a la despolarización que describimos en este trabajo en CCs de rata, surgió un comentario [178] en el que se plantean algunas preguntas que han surgido de esta investigación: 1. ¿Cuál es la contribución de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares durante los modos de disparo tónicos o en ráfaga de potenciales de acción? 2. ¿Qué isoforma de CaVs de alto umbral está preferencialmente acoplado a la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares y la secreción de CAs? 3. La alta heterogeneidad en la contribución de los CaVs y los depósitos intracelulares a la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ¿también se observa en las CCs en rebanada o *in vivo*? 4. ¿Es la contribución de la liberación de Ca^{2+} desde el RE idéntica en condiciones de salud o enfermedad? Son algunas de las preguntas que surgen de esta investigación y que pueden evaluarse en estudios a futuro.

En conjunto, los datos de los registro simultáneos y su análisis apoyan fuertemente una de las principales conclusiones de esta segunda parte del estudio: que la cinética de la señal de Ca^{2+} determina los atributos de la señal amperométrica resultante. En otras palabras, la cinética de la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ establece de manera predecible y robusta la velocidad de la exocitosis de CAs en las CCs de rata.

Registro simultáneo de la dinámica de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs en CCs individuales antes, durante y después de la aplicación de CPA

Como una “prueba de concepto” de los hallazgos de esta investigación, se realizó el

registro simultáneo de los $t-[Ca^{2+}]$ y la respuesta amperométrica de CCs de rata antes, durante y después de la inhibición de la captación de Ca^{2+} del RE por CPA (figuras 24A y B). El 1er estímulo despolarizante produjo un $t-[Ca^{2+}]$ con los componentes temprano y tardíos casi fusionados (figura 24A, a1) que resultó en la descarga de dos ráfagas de espigas amperométricas (asteriscos negro y rojo en figura 24B, b1). El 2do estímulo despolarizante, 30 s después, generó una señal de Ca^{2+} de menor amplitud y con los dos componentes aun presentes que dieron lugar a un tren único de espigas amperométricas a una menor frecuencia, probablemente debido a la recuperación incompleta de los gránulos del *pool* listo para liberar [121] [122] [152] [176]. Durante la aplicación de CPA, el componente tardío desaparece por completo afectando menos al componente temprano (figura 24A, a2) mientras se genera una breve descarga compacta de disparos amperométricos con unas cuantas espigas (figura 24B, b2). Después de retirar el CPA, el componente tardío del $t-[Ca^{2+}]$ reaparece (figura 24A, a3) y, con ellos, la doble ráfaga de espigas amperométricas (figura 24B, b3). El último estímulo despolarizante inició una señal de Ca^{2+} débil con los dos componentes presentes que condujo a la generación de muy pocas espigas amperométricas.

De este experimento se concluye que la liberación de Ca^{2+} del RE por el mecanismo de CICR constituye el principal determinante del acoplamiento estímulo—secreción en las CCs de rata. Observe que, durante el tratamiento con CPA, que bloquea la liberación de Ca^{2+} desde el RE, la secreción cae abruptamente en la misma célula. Al retirar el CPA, se restablece la liberación de Ca^{2+} desde el RE y, entonces, la secreción de CAs se hace más robusta que durante el tratamiento farmacológico (figura 24Cb3, b4). Este experimento evidencia uno de los principales resultados de este estudio: el mecanismo de CICR inducido por despolarización contribuye a la exocitosis de CAs. Esta observación es relevante pues, sin el uso de fármacos como se ha hecho en la mayoría de los estudios, obtenemos evidencia de que la liberación de Ca^{2+} del RE tras la entrada del ión a la célula desencadena la secreción de CAs, un aspecto que se discutirá luego en esta misma sección.

La exocitosis de CAs inducida por fármacos que liberan Ca^{2+} del RE siempre ha estado bajo discusión. Algunos autores como Kim & Westhead [179] empleando registro simultáneo en CCBs muestran que la liberación de Ca^{2+} por el RE empleando bradiquinina, que aumenta la [IP3] en el citosol, no conduce a la exocitosis de CAs y concluye que la entrada de Ca^{2+} es la única señal efectiva conducente a la liberación hormonal. En contraste, nosotros mostramos en CCs de rata que la liberación de Ca^{2+} desde el RE por el mecanismo de CICR es el actor principal en el escenario de la exocitosis. Nuestro dato es consistente con lo mostrado por Warashina et al. [181], quienes, tras la aplicación de bradiquinina, observan liberación de CAs en la glándula adrenal perfundida de rata. No obstante, dado que las medidas de secreción de CAs en glándula adrenal perfundida se hacen en escala temporal de minutos, no es posible

derivar los cambios cinéticos finos de la exocitosis a nivel celular [103], como lo abordamos en este trabajo. Ahora, aunque Kim & Westhead [179] señalan inicialmente que la liberación de Ca^{2+} del RE no conduce a exocitosis en CCBs, varias líneas de evidencia muestran lo contrario. Aquí nosotros mostramos que la liberación de Ca^{2+} del RE de CCBs es funcional y resulta en la exocitosis de CAs (figura 20), una observación que es corroborada por otros investigadores. Por ejemplo, Cheek et al. [180] con registros simultáneos mediante co-cultivo de CCBs con células NIH—3T3, observa que agentes que incrementan la $[\text{IP}_3]$ en el citosol como la angiotensina II producen liberación de CAs, aunque con muy baja potencia y eficacia. Por su parte, empleando fluorimetría de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y registro de cambios en la capacitancia de la membrana en CCBs, Augustine & Neher [152] probaron que la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares inducida por bradiquinina produce fusión de GCCs a la membrana plasmática. Ellos también observan poca potencia y eficacia en la liberación de CAs realizando esta maniobra y concluyen que la posición privilegiada de los CaVs es la responsable del efecto altamente potente que tiene la entrada del ión sobre la secreción. Asimismo, mediante fluorimetría de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pero detectando secreción con amperometría, Finnegan & Wightman [177] empleando cafeína y bradiquinina en CCBs; y Finnegan et al [142] aplicando cafeína, bradiquinina y metacolina en CCs de rata demuestran también aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ acompañada de exocitosis de CAs. Un dato relevante del estudio de Finnegan et al [142] es que menores concentraciones de los fármacos que utilizan para movilizar Ca^{2+} del RE son necesarias para causar exocitosis en CCs de rata respecto a CCBs, por lo que sugieren que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ es mayor en CCs de rata que en CCBs. Este último hallazgo es consistente con la hipótesis aquí planteada acerca de que la liberación de Ca^{2+} del RE por el mecanismo de CICR en CCs de rata es el principal determinante del acoplamiento estímulo—secreción. Es probable que estas discrepancias entre las CCs de bovino y de rata se deban a que la contribución de los distintos componentes de la triada funcional a la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y exocitosis de CAs es específica de la especie [67] [75] [85] [92]. Un argumento en favor de esta visión es que en CCs de ratón (CCMs) se ha observado un mecanismo de CICR débil y una captación fuerte [91] [116], en contraste con lo que se ha discutido en CCs de rata y CCBs. Tomando todos estos hallazgos en conjunto es válido concluir que la ganancia del mecanismo de CICR es alta en CCs de rata, muy baja en CCMs y presenta valores intermedios entre estos dos en CCBs.

Como se mencionó previamente, una diferencia fundamental entre nuestro trabajo y aquellos estudios de registro simultáneo que demuestran que la liberación de Ca^{2+} del RE contribuye a la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs, es que en estos últimos se emplean fármacos para forzar la movilización de Ca^{2+} desde el organelo [142] [152] [172] [180]. En contraste, con el solo estímulo despolarizante con alto K^+ , nosotros observamos dos componentes cinéticamente diferentes tanto en la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como en la respuesta amperométrica (figura 24) que logramos disectar con fármacos e identificamos

secuencialmente como: i. la entrada (predominante) de Ca^{2+} a la célula, y, ii. la liberación de Ca^{2+} del RE, siendo este último componente altamente sensible a CPA (figura 18B), rianodina (figura 21B) y cafeína (figura 21B). Observando directamente las variaciones en la cantidad de Ca^{2+} en el RE mediante aequorina mutante dirigida a este organelo, Alonso et al [115] demuestra que el solo estímulo con alto K^+ produce la liberación de 100-200 μM de Ca^{2+} hacia el citosol. Estas cantidades liberadas representan un cambio de 1-2 μM en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [182] [183]. Esta concentración de Ca^{2+} libre en el citosol bien puede conducir tanto a la fusión de GCCs y liberación de CAs como reporta Augustine & Neher [152] como a la movilización de GCCs desde regiones adentro de la célula hacia el subplasmalema durante las etapas tempranas de la exocitosis, como sugiere von Ruden & Neher [154]. A partir de nuestros datos no podemos afirmar qué cantidad absoluta de Ca^{2+} sale del RE, sin embargo, relativamente, cuando se compara el efecto de la liberación de Ca^{2+} desde el organelo (componente tardío) respecto al efecto que tiene la entrada del ión a la célula (componente temprano) sobre la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción de CAs, medidas de manera simultánea, observamos que buena parte de la movilización de Ca^{2+} que lleva a la exocitosis hormonal es proveída por la acción de transporte iónico desde el depósito de Ca^{2+} (figura 24). Con nuestros datos tampoco podemos definir en qué proporción el mecanismo de CICR se utiliza para la movilización de los gránulos hacia el subplasmalema [154] o para la fusión de estos a la membrana plasmática [152] [155], sin embargo, observamos inequívocamente que la movilización de Ca^{2+} por el depósito intracelular sensible a CPA, Ry y cafeína, tiene una influencia importante sobre la fusión de GCCs, pues directamente, en la misma célula, observamos la masiva liberación de CAs precedida por una señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ prominente procedente del RE.

Con base en los resultados que se generaron de esta investigación, Tuluc & Carbone [178] sugirieron un modelo para explicar la movilización de Ca^{2+} intracelular —gatillada por despolarización— que conduce a la exocitosis de CAs en CCs de rata (figura 25). En este modelo el mecanismo de CICR representa un papel central, de alguna manera similar al que se ha observado en cardiomiocitos durante el acoplamiento excitación—contracción [184] [185]. La entrada de Ca^{2+} a través de los CaVs de alto umbral (HVCC) actúa principalmente para activar los RyR localizados sobre la membrana del RE. Así, la liberación de Ca^{2+} del RE por el mecanismo de CICR junto con la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de los HVCC proveen los iones libres necesarios para que la exocitosis hormonal se ejecute.

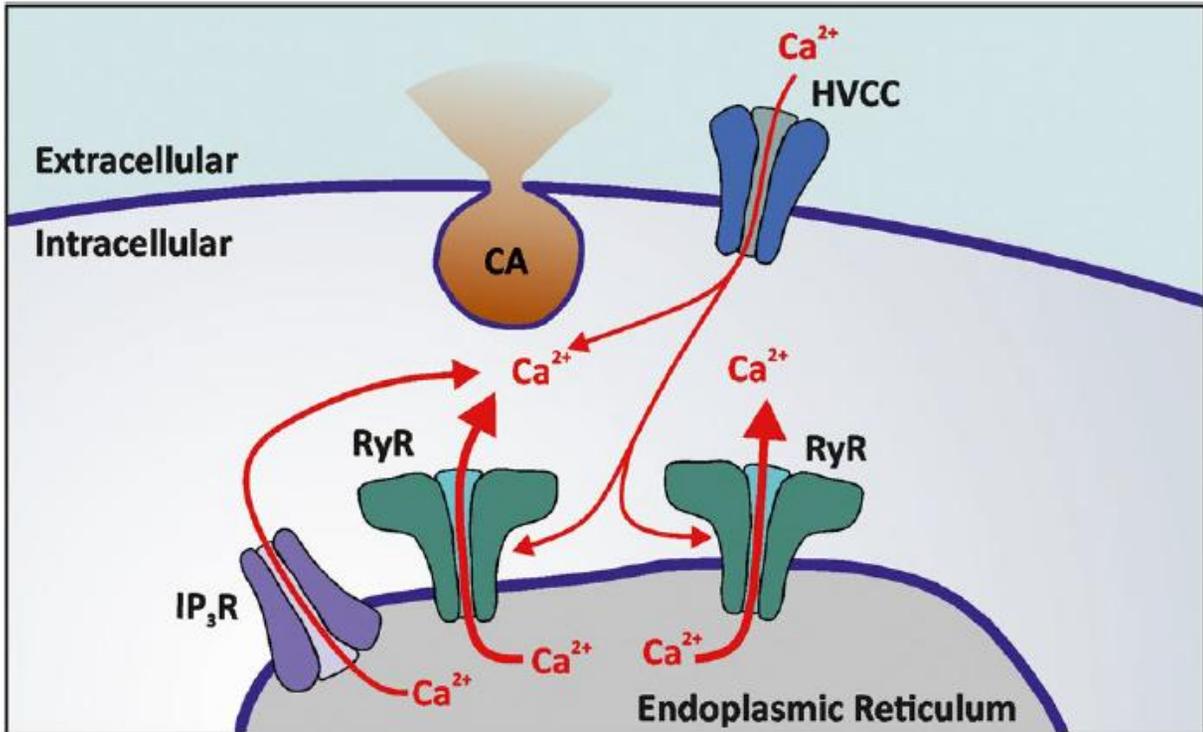


Figura 25. Modelo de movilización de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por despolarización en CCs de rata. Tuluc & Carbone [178] proponen en su comentario sobre este trabajo un modelo en el que la entrada de Ca^{2+} a través de los CaVs de alto umbral (HVCC) en las CCs de rata es apenas necesario para activar los RyRs por el mecanismo de CICR, lo que conduce a cambios globales en la $[Ca^{2+}]_i$ que constituye la señal que finalmente controla la excitación de CAs. Tomado de [178].

Posible explicación fisiológica de los $t-[Ca^{2+}]_i$ con uno o dos componentes en las CCs de rata

Una pregunta que falta por abordar es: ¿qué está sucediendo en una célula que presenta $t-[Ca^{2+}]_i$ con dos componentes en comparación con las que tienen solo uno? En el laboratorio se ha demostrado previamente que el $t-[Ca^{2+}]_i$ aparece con una demora de 1.1 s después que se ha estimulado la entrada de Ca^{2+} a la célula con un pulso despolarizante de alto K^+ . En comparación, la señal de Ca^{2+} demora en aparecer 5 s cuando se estimula la liberación intracelular de Ca^{2+} desde el RE con cafeína [104]. Con esto en mente, una posible explicación fisiológica para los $t-[Ca^{2+}]_i$ con uno o dos componentes es la *eficiencia del acoplamiento* entre la entrada de Ca^{2+} a través de los CaVs y la liberación de Ca^{2+} del RE a través de los RyRs por el mecanismo de CICR. Un *acoplamiento fuerte*, dado por una posible proximidad entre los sitios de entrada de Ca^{2+} a la célula y los sitios de liberación intracelular de Ca^{2+} del RE, daría lugar a un $t-[Ca^{2+}]_i$ con un solo componente. Dicho $t-[Ca^{2+}]_i$ representaría los dos fenómenos: la entrada inicial de Ca^{2+} (durante los primeros segundos) ensanchada por

la salida de Ca^{2+} del RE por el mecanismo de CICR (en los segundos restantes). Por otra parte, un *acoplamiento débil*, debido quizá a una distancia difusional más grande entre los sitios de entrada de Ca^{2+} a la célula y los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , resultaría en un $t_{-}[\text{Ca}^{2+}]$ con los componentes temprano y tardíos separados por una latencia. De igual manera, este $t_{-}[\text{Ca}^{2+}]$ reflejaría dos fenómenos independientes: la entrada de Ca^{2+} dependiente de voltaje, representado por el componente temprano rápido, seguido por la liberación de Ca^{2+} desde el RE, dado por el componente tardío lento.

La heterogeneidad de los $t_{-}[\text{Ca}^{2+}]$ que desencadenan la exocitosis de CAs que observamos en distintas poblaciones de CCs en esta investigación ha sido poco estudiada, por lo que se entiende poco acerca de los mecanismos que subyacen a esta diversidad de respuestas. Aunque a partir de nuestros resultados no es posible establecer un mecanismo que explique un acoplamiento fuerte y un acoplamiento débil como la base de la heterogeneidad de respuestas que se observan en las CCs de rata ante un estímulo despolarizante, algunos aspectos estructurales y funcionales abordados en investigaciones previas pueden ayudarnos a respaldar la hipótesis que planteamos. Para especular sobre los aspectos mecánicos detrás de la heterogeneidad observada en las CCs de rata se deben tener en cuenta tres ejes de argumentación fundamentales: las propiedades espaciales y difusionales del Ca^{2+} en el citosol de las CCs, la arquitectura subcelular de las CCs y los factores bioquímicos y moleculares que determinan la movilización de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. En primer lugar, se ha reportado que las CCs tienen predominancia de amortiguadores de Ca^{2+} fijos o poco móviles en el citosol [173] aunque también se ha encontrado una pequeña proporción de células que expresarían amortiguadores de Ca^{2+} altamente móviles en este compartimento [172]. Los amortiguadores fijos o poco móviles hacen que el rango de difusión de los picos localizados de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sea de apenas unas micras lejos de la fuente del ión [187]. En contraste, los amortiguadores móviles durante un pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pueden unir rápidamente el Ca^{2+} y distribuirlo en el citosol lejos de la fuente hacia regiones de la célula con menor $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en donde eventualmente pueden liberarlo [172]. La presencia de amortiguadores fijos o poco móviles en la mayoría de CCs y una combinación de estos con amortiguadores móviles en otra pequeña población de células permiten indistintamente que, tras un estímulo con alto K^+ de 1 s en duración como el que se empleó en este trabajo, el Ca^{2+} que entra a la célula forme un gradiente espacial que le permite al ión viajar desde el subplasmalema hasta regiones bien adentro de la célula como el núcleo [115] [193] [194]. Notablemente, los amortiguadores fijos o poco móviles llevan a que la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la secreción decaigan lentamente, mientras que los amortiguadores móviles hacen que estos dos parámetros decaigan rápidamente [113]. Además del hecho de que el Ca^{2+} puede viajar a cualquier lugar de la célula, la importancia de estas observaciones en nuestro contexto es que existen dos grupos de CCs: una gran población de CCs con predominancia de

amortiguadores fijos o poco móviles y una pequeña población de CCs con expresión de amortiguadores móviles. En segundo lugar, en lo que se refiere a la arquitectura subcelular de las CCs, O'Sullivan et al. [175] combinando microscopía electrónica y fluorimetría de Ca^{2+} encuentra que el RE en algunas CCBs se ubica preferencialmente en un polo de la célula, con ausencia del organelo en el polo opuesto de éstas. Correspondientemente, observan dos componentes en la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por bradiquinina separados cinéticamente por una demora de 10 s. Dichos componentes, separados en el tiempo por una demora, también se encuentran separados espacialmente: el componente temprano de la señal se localiza intracelularmente en el polo de la célula donde presumiblemente se encuentra el RE, mientras el componente tardío del transitorio, 10 s después, se localiza en el polo opuesto de la célula en la región del subplasmalema. Por su parte, mediante microscopía confocal e inmunofluorescencia, Inoue et al [194] reportan también que el depósito de Ca^{2+} sensible a cafeína en CCs de rata se encuentra en uno de los extremos de la célula. Lo relevante de estos hallazgos en el contexto de nuestra hipótesis es que el RE no tiene una distribución al azar en la célula, sino que se encuentra ubicado en regiones específicas en el citoplasma, unas cercanas al subplasmalema y otras lejanas de este compartimento [194]. Finalmente, por medio de abordajes que involucran ensayos bioquímicos y moleculares se ha encontrado una amplia variedad funcional de las proteínas que participan en la movilización de Ca^{2+} entre el RE y el citosol. Rooney & Meldolesi [195] mediante fraccionamiento subcelular de células PC-12 encuentran que distintas porciones del RE tienen diferente proporción de la bomba SERCA respecto a los canales IP3R y RyRs, lo que sugiere un alto grado de heterogeneidad en las características estructurales del organelo que muy probablemente conducen a funciones diferentes en dependencia de la distribución de esas proteínas [183]. No solo la distribución del bombeo y la liberación de Ca^{2+} en diferentes regiones del RE serían responsables de su alta heterogeneidad, las proteínas lumenales de unión a Ca^{2+} al interior del organelo podrían ser otra fuente de variabilidad en CCs. En Células PC-12, Pezzati et al. [196] muestran que diferentes cisternas del RE tienen diferentes cantidades de Ca^{2+} e hipotetizan que esto podría deberse a una concentración diferencial de proteínas como calsecuestrina en estos subcompartimentos que conforman el organelo. De manera que la alta variabilidad de respuestas del RE en CCs ante un estímulo podría deberse a la heterogeneidad inherente a su estructura [197]. La amplia variabilidad estructural y funcional del RE se ha encontrado también en otros modelos celulares como los astrocitos y células musculares [198]. El aprendizaje que nos queda de esta tercera parte es que las proteínas responsables de la movilización de Ca^{2+} (SERCA, RyR, IP3R) no se distribuyen al azar en el RE y, por el contrario, forman unidades funcionales complejas.

Con base en los tres ejes de argumentación expuestos anteriormente se puede hipotetizar sobre el posible mecanismo detrás de la heterogeneidad de respuestas expresada

en los fenómenos de acoplamiento *débil* y el acoplamiento *fuerte* que aquí proponemos. Durante el **acoplamiento débil**, caracterizado por la presencia de la señal bifásica de $[Ca^{2+}]_i$ en una pequeña proporción (10-15%) de CCs de rata, el Ca^{2+} que entra a la célula sería rápidamente unido por el amortiguador de Ca^{2+} de alta movilidad lo que llevaría a que la señal de $[Ca^{2+}]_i$ decaiga en el acto [113]. Como reportan Zhou & Neher [172], el amortiguador de Ca^{2+} de alta movilidad se expresa en tan solo una pequeña proporción de CCs, en concordancia con la pequeña proporción de CCs en las que encontramos un acoplamiento débil. Mientras ocurre el decaimiento rápido del componente temprano de la señal de $[Ca^{2+}]_i$, parte del Ca^{2+} que entró a la célula contacta al RE en uno de los polos de la CC [175] y abre los RyR que, entonces, liberan el Ca^{2+} contenido en el depósito con una cierta demora; lo cual explicaría la aparición del componente tardío de la señal bifásica de $[Ca^{2+}]_i$. La demora entre el componente temprano y tardío de la señal de $[Ca^{2+}]_i$ puede explicarse por el tiempo que le toma al ión cubrir la distancia entre los sitios de entrada del ión y el depósito de Ca^{2+} sensible a CPA al interior de la célula. La evidente heterogeneidad en la movilidad de Ca^{2+} por el RE reportada aquí por nosotros (figura 18B) y por otros investigadores [142] [175] [177], podría deberse a la expresión diferencial de las proteínas encargadas de la movilización del ión (SERCA, RyRs, IP3R) a lo largo de la red de cisternas que conforman el RE y que le confieren al organelo una compleja organización estructural que entre células sería altamente variable [195] [196] [197]. Dicha heterogeneidad podría conducir a la generación de distintas características cinéticas en la captación y liberación de Ca^{2+} desde el reservorio. Así, CCs con un componente tardío prominente posiblemente expresan grandes cantidades de RyRs. Al contrario, en las CCs con baja expresión de este canal intracelular, la liberación sería menos evidente.

En cuanto al fenómeno del **acoplamiento fuerte** que observamos en la mayoría de CCs de rata y que se caracteriza por una señal de $[Ca^{2+}]_i$ en la que no es posible discernir cinéticamente entre el componente temprano y el tardío, podría corresponder a CCs que tienen en su citosol predominancia de amortiguadores de Ca^{2+} fijos o poco móviles, por lo que no hay un decaimiento inmediato de la señal tras el pico de $[Ca^{2+}]_i$ [113]. Consistente con el hecho de que la mayoría de CCs presentan un acoplamiento fuerte, Augustine & Neher [173] reportan que la mayoría de las CCs expresan en su citosol amortiguadores de Ca^{2+} fijos o poco móviles. En las CCs que responden de esta manera es posible que el RE no tenga una localización polarizada en la célula. Naturalmente, la hipótesis aquí presentadas pueden someterse a prueba experimental en el futuro.

En estudios previos en el laboratorio se observó que la despolarización de la membrana generaba una elevación de $[Ca^{2+}]_i$ y una secreción de CAs tres veces más grandes en CCs de ratas SHR que en CCs de ratas WKY, y que la aplicación de Ry reducía significativamente (77%)

la carga acumulada con una caída de 71% en el número de espigas [104]. Con ello se demostraba que la contribución del mecanismo de CICR al fenotipo hipersecretor de CAs en CCs de ratas SHR está mediado por señales intracelulares de Ca^{2+} más robustas. Entre las posibles explicaciones para la alta ganancia del mecanismo de CICR en CCs de ratas SHR están:

1. Mayor contenido de Ca^{2+} en el RE.
2. Mayor densidad de receptores de rianodina (RyR) en el RE.
3. Hipersensibilidad de los RyR al Ca^{2+} por una inhibición deficiente por la calmodulina.

El efecto agudo y reversible de la inhibición de la bomba SERCA por CPA sobre las señales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la exocitosis de CAs disparadas por estímulos despolarizantes (1 s) fue evaluado en CCs de ratas SHR y CCs de ratas WKY que, como se mencionó previamente, difieren en la ganancia del mecanismo de CICR. Los resultados de esta investigación muestran que la aplicación de CPA disminuye la exocitosis estimulada de manera similar en las CCs de ambos grupos de ratas. Sin embargo, después del mismo tratamiento, la señal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye más significativamente en CCs de ratas SHR que en su contraparte WKY (p -valor <0.001), sugiriendo que el RE en las CCs de las ratas hipertensas tiene mayor capacidad de liberación de Ca^{2+} por el mecanismo de CICR que las CCs de las ratas normotensas. No obstante, se requieren más estudios para identificar a qué se debe esta mayor capacidad de transporte de Ca^{2+} hacia el citosol desde el RE en CCs de ratas SHR.

Dado que la Ry específicamente suprime la hipersecreción de CAs en CCs de ratas hipertensas (SHR), se podría proponer que moléculas con una acción inhibitoria similar sobre los RyR atenuarían el desarrollo de la hipertensión arterial (HTA) en este modelo animal. Sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento crónico con dantroleno, un agente conocido por estabilizar los RyR en el músculo esquelético y usado para tratar la hipertermia maligna, no previene el desarrollo de la HTA en estas ratas [126]. Por su parte, agentes que inhiben la actividad de la bomba SERCA, como el CPA, que suprime la secreción de CAs de manera similar en CCs de ratas SHR y WKY, probablemente no sean una buena opción terapéutica para tratar la HTA.

El hallazgo de que la hipersecreción de CAs en CCs de ratas hipertensas (SHR) desaparece con la estimulación repetitiva podría ser importante para entender la contribución que tienen las CCs de este modelo animal al desarrollo y la fisiopatología de la HTA.

X. Conclusiones

1. La velocidad y la magnitud de la secreción de CAs de las CCs de ratas WKY y SHR en respuesta a estímulos repetitivos decae notoriamente después del primer estímulo. Este decaimiento es más marcado en las CCs de ratas SHR dado que secretan más CAs con el estímulo inicial.
2. El decaimiento de la exocitosis después del primer estímulo en las CCs de WKY y SHR no se acompaña de una disminución similar en las señales de $[Ca^{2+}]_i$, las cuales se mantienen. Esta observación y la conclusión del punto 1 sugieren fuertemente que las CCs de ratas SHR tienen un pool de gránulos listo para liberar (PLL) más grande que las CCs de ratas WKY.
3. Las CCs de ratas SHR tienen mayor ganancia del mecanismo de CICR que las CCs de ratas WKY tras la entrada de Ca^{2+} a la célula. Esta diferencia no hace que la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por despolarización sea significativamente más grande en las CCs de SHR, lo que sugiere mecanismos compensatorios de movilización de Ca^{2+} en las CCs de ratas normotensas.
4. El RE de CCs de rata (*Rattus norvegicus*) se comporta como un surtidor de Ca^{2+} con un mecanismo de CICR fuerte y una captación de Ca^{2+} relativamente débil. Este comportamiento del RE es similar al que se observa en las CCs de bovino (*Bos Taurus*) y diferente del de las CCs de ratón (*Mus musculus*).
5. La movilización de Ca^{2+} desde pozas intracelulares de Ca^{2+} sensibles a CPA, rianodina y cafeína tiene características cinéticas heterogéneas en la población de CCs de rata.
6. Las características cinéticas de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ obtenidas con un indicador fluorescente sensible al Ca^{2+} determinan de manera predecible y robusta la cinética de la exocitosis de CAs medida en la misma CC de rata.
7. Luego de un estímulo despolarizante, las CCs de rata presentan mayor liberación de Ca^{2+} por el mecanismo CICR, lo que conduce a una mayor exocitosis de CAs. En este sentido, la ganancia del mecanismo de CICR es el principal determinante del acoplamiento estímulo—secreción de las CCs de rata.

XI. Referencias

1. Greenblatt, RB. (1977). Search the Scriptures. J.P. Lippincott, pp, 45-48, Philadelphia, USA.
2. Carmichael, SW. (1986). The adrenal medulla. New York, Oxford University Press.
3. Eustachius, B. (1563). Tabular Anatomica. Chapter VL, Vemica.
4. Lenard, A. (1951). The History of Research on the Adrenals 1563–1900. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 6(4), 496–505. <http://www.jstor.org/stable/24619970>
5. Carmichael, S. W., & Winkler, H. (1985). The Adrenal Chromaffin Cell. *Scientific American*, 253(2), 40–49. <http://www.jstor.org/stable/24967764>
6. Leoutsakos, B., & Leoutsakos, A. (2008). The adrenal glands: a brief historical perspective. *Hormones (Athens, Greece)*, 7(4), 334–336. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1216>
7. Ghosh, A. and S. Chatterjee. The avian adrenal medulla and the effects of ascorbic acid on adrenomedullary hormones. *Indian Rev Life Sci* 6:67-73, 1986.
8. Sakharov, D.A. and Zhuravleva, L.M. (1988). [The origin of chromaffin tissue in vertebrates: The chromaffin cells of ascidians.] *Zh Obshch Biol* 49:218 - 226.
9. Milano, E. G., & Accordi, F. (1986). Evolutionary trends in adrenal gland of anurans and urodeles. *Journal of morphology*, 189(3), 249–259. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051890304>
10. David O. Norris, James A. Carr. (2021). Chapter 9 - Comparative aspects of vertebrate adrenals. Vertebrate Endocrinology (Sixth Edition). *Academic Press*. Pages 291-313. ISBN 9780128200933. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820093-3.00009-5>
11. David O. Norris, James A. Carr. (2021). Chapter 8 - The mammalian adrenal glands: cortical and chromaffin cells. Vertebrate Endocrinology (Sixth Edition). *Academic Press*. Pages 259-289. ISBN 9780128200933. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820093-3.00008-3>
12. Hebel R., Stromberg M.W. (1986). Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat. BioMed Verlag.
13. Robert Lewis Maynard, Noel Downes. (2019). Chapter 16 - Endocrine Glands. Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research. *Academic Press*. Pages 185-196. ISBN 9780128118375, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811837-5.00016-2>
14. Bartholin C. (1626). Anatomicae Institutiones Corporis Humani, Utriusque Sexus Historiam et Declarationem Exhibentes. Germany, Conradus Scher.
15. Flint, J. M. (1900). The blood vessels, angiogenesis, organogenesis, reticulum, and histology of the adrenal. *Johns Hopkins Hospital Reports* 9, 153-229.
16. Vinson, G. P., Pudney, J. A., & Whitehouse, B. J. (1985). The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. *Journal of Endocrinology*, 105(2), 285-NP. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1050285>
17. Dutt M, Wehrle CJ, Jialal I. Physiology, Adrenal Gland. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537260/>

18. Nicolaides, N. C., Charmandari, E., & Chrousos, G. P. (2014). Adrenal Steroid Hormone Secretion. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.00100-8>
19. Megha R, Wehrle CJ, Kashyap S, et al. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Adrenal Glands (Suprarenal Glands) [Updated 2022 Oct 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482264/>
20. Abdellatif, A. B., Fernandes-Rosa, F. L., Boulkroun, S., & Zennaro, M. C. (2022). Vascular and hormonal interactions in the adrenal gland. *Frontiers in endocrinology*, *13*, 995228. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.995228>
21. Maynard, R. L., & Downes, N. (2019). Endocrine Glands. *Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research*, 185–196. <https://doi:10.1016/b978-0-12-811837-5.00016-2>
22. Inomata, Akira & Sasano, Hironobu. (2015). Practical approaches for evaluating adrenal toxicity in nonclinical safety assessment. *Journal of Toxicologic Pathology*. 28. 10.1293/tox.2015-0025.
23. de Diego, A. M., Gandía, L., & García, A. G. (2008). A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta physiologica (Oxford, England)*, *192*(2), 287–301.
24. Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2021). *The Autonomic Nervous System and the Adrenal Medulla. Textbook of Medical Physiology*. 14th edn. Elsevier-Saunders, Philadelphia.
25. Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2021). *Nervous regulation of the circulation and rapid control of arterial pressure. Textbook of Medical Physiology*. 14th edn. Elsevier-Saunders, Philadelphia.
26. Bernard, C. (1879). *Leçons sur les phénomènes de la vie commune aux animaux et aux végétaux (Vol. 2)*. Baillière.
27. Cannon, W. B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological reviews*, *9*(3), 399-431.
28. Carbone, E., Borges, R., Eiden, L. E., García, A. G., & Hernández-Cruz, A. (2019). Chromaffin Cells of the Adrenal Medulla: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Comprehensive Physiology*, *9*(4), 1443–1502. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190003>
29. Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Argüelles, H., & Borges, R. (2008). Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta physiologica (Oxford, England)*, *192*(2), 145–163. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01811.x>
30. Kajiwara, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M. E., & Iijima, T. (1997). Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *The Japanese journal of physiology*, *47*(5), 449–464. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.47.449>
31. Kesse, W. K., Parker, T. L., & Coupland, R. E. (1988). The innervation of the adrenal gland.

- I. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. *Journal of anatomy*, 157, 33–41.
32. Strack, A. M., Sawyer, W. B., Marubio, L. M., & Loewy, A. D. (1988). Spinal origin of sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Brain research*, 455(1), 187–191. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90132-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90132-1)
33. Cryer P. E. (1980). Physiology and pathophysiology of the human sympathoadrenal neuroendocrine system. *The New England journal of medicine*, 303(8), 436–444. <https://doi.org/10.1056/NEJM198008213030806>
34. Tischler A. S. (2002). Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 971, 366–370. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04498.x>
35. Tomlinson, A., & Coupland, R. E. (1990). The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *Journal of anatomy*, 169, 209–236. [PMCID: PMC1256968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1256968/).
36. Parker, T. L., Kesse, W. K., Mohamed, A. A., & Afework, M. (1993). The innervation of the mammalian adrenal gland. *Journal of anatomy*, 183 (Pt 2)(Pt 2), 265–276. [PMCID: PMC1259907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1259907/)
37. Ohtsuki, H., Morita, K., Minami, N., Suemitsu, T., Tsujimoto, A., & Dohi, T. (1992). Involvement of Ca²⁺ entry and inositol trisphosphate-induced internal Ca²⁺ mobilization in muscarinic receptor-mediated catecholamine release in dog adrenal chromaffin cells. *Neurochemistry international*, 21(2), 259–267.
38. Morrison, S. F., & Cao, W. H. (2000). Different adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and norepinephrine secretion. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279(5), R1763–R1775. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1763>
39. Coupland R. E. (1965). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *Journal of anatomy*, 99(Pt 2), 255–272.
40. Heym, C., Braun, B., Klimaschewski, L., & Kummer, W. (1995). Chemical codes of sensory neurons innervating the guinea-pig adrenal gland. *Cell and tissue research*, 279(1), 169–181. <https://doi.org/10.1007/BF00300702>
41. Mohamed, A. A., Parker, T. L., & Coupland, R. E. (1988). The innervation of the adrenal gland. II. The source of spinal afferent nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. *Journal of anatomy*, 160, 51–58.
42. Kikuta, A., Ohtani, O., & Murakami, T. (1991). Three-dimensional organization of the collagen fibrillar framework in the rat adrenal gland. *Archives of histology and cytology*, 54(2), 133–144. <https://doi.org/10.1679/aohc.54.133>
43. Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2021). Local and humoral control of tissue blood flow. *Textbook*

of *Medical Physiology*. 14th edn. Elsevier-Saunders, Philadelphia.

44. Tischler AS & Delellis RA. (1988). The Rat Adrenal Medulla. I. The Normal Adrenal. *Journal of the American College of Toxicology*, 7(1), 1-21. <https://doi.org/10.3109/10915818809078700>

45. Tomlinson, A., Durbin, J., & Coupland, R. E. (1987). A quantitative analysis of rat adrenal chromaffin tissue: morphometric analysis at tissue and cellular level correlated with catecholamine content. *Neuroscience*, 20(3), 895–904. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90250-8](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90250-8)

46. Kigata, T., & Shibata, H. (2017). Anatomical variations of the arterial supply to the adrenal gland in the rat. *The Journal of veterinary medical science*, 79(2), 238–243. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0428>

47. Jiménez, N., & Hernández-Cruz, A. (2001). Modifications of intracellular Ca²⁺ signalling during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of rat adrenal chromaffin cells. *The European journal of neuroscience*, 13(8), 1487–1500. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01524.x>

48. Koval, L. M., Yavorskaya, E. N., & Lukyanetz, E. A. (2000). Ultrastructural features of medullary chromaffin cell cultures. *Neuroscience*, 96(3), 639–649. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00563-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00563-1)

49. Gnegy, M.E. (2012). Catecholamines. *Basic neurochemistry. American Society for Neurochemistry*. 8th edn. Chapter 14. Elsevier Inc.

50. Flatmark T, Tenland O. (1971). Cytochrome b1 of the bovine adrenal chromaffin granules. A high potential b-type cytochrome. *Biochim Biophys Acts* 253:487-91. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(71\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(71)90052-1)

51. Srivastava M, Duong LT, Fleming Pi. (1984). Cytochrome b1 catalyzes transmembrane electron transfer. *J Biol Chem* 259:8072-5. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39692-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39692-8)

52. Mosharov, E. V., Gong, L. W., Khanna, B., Sulzer, D., & Lindau, M. (2003). Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(13), 5835–5845. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05835.2003>

53. Goldstein, D. S., Sullivan, P., Holmes, C., Miller, G. W., Alter, S., Strong, R., Mash, D. C., Kopin, I. J., & Sharabi, Y. (2013). Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 126(5), 591–603. <https://doi.org/10.1111/jnc.12345>

54. Estévez-Herrera, J., González-Santana, A., Baz-Dávila, R., Machado, J. D., & Borges, R. (2016). The intravesicular cocktail and its role in the regulation of exocytosis. *Journal of neurochemistry*, 137(6), 897–903. <https://doi.org/10.1111/jnc.13609>

55. Neher E. (2018). Neurosecretion: what can we learn from chromaffin cells. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 470(1), 7–11. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2051-6>

56. Estévez-Herrera, J., Domínguez, N., Pardo, M. R., González-Santana, A., Westhead, E. W.,

- Borges, R., & Machado, J. D. (2016). ATP: The crucial component of secretory vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(28), E4098–E4106. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600690113>
57. Machado, J. D., Camacho, M., Alvarez, J., & Borges, R. (2009). On the role of intravesicular calcium in the motion and exocytosis of secretory organelles. *Communicative & integrative biology*, 2(2), 71–73. <https://doi.org/10.4161/cib.7467>
58. Díaz-Vera, J., Camacho, M., Machado, J. D., Domínguez, N., Montesinos, M. S., Hernández-Fernaud, J. R., Luján, R., & Borges, R. (2012). Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation, but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(1), 430–438. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181941>
59. Neher E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3), 389–399. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80983-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80983-6)
60. Gillis, K. D., & Chow, R. H. (1997). Kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Seminars in cell & developmental biology*, 8(2), 133–140. <https://doi.org/10.1006/scdb.1996.0132>
61. Eisenhofer, G., Rundquist, B., Aneman, A., Friberg, P., Dakak, N., Kopin, I. J., Jacobs, M. C., & Lenders, J. W. (1995). Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(10), 3009–3017. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.10.7559889>
62. Eisenhofer G. (2001). The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacology & therapeutics*, 91(1), 35–62. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(01\)00144-9](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(01)00144-9)
63. Douglas, W. W., & Rubin, R. P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *The Journal of physiology*, 159(1), 40–57. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1961.sp006791>
64. Llinás, R., Steinberg, I. Z., & Walton, K. (1981). Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. *Biophysical journal*, 33(3), 323–351. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(81\)84899-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(81)84899-0)
65. García, A. G., García-De-Diego, A. M., Gandía, L., Borges, R., & García-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiological reviews*, 86(4), 1093–1131. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2005>
66. García, A. G., Padín, F., Fernández-Morales, J. C., Maroto, M., & García-Sancho, J. (2012). Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell calcium*, 51(3-4), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.12.004>
67. García-Sancho J. (2014). The coupling of plasma membrane calcium entry to calcium uptake by endoplasmic reticulum and mitochondria. *The Journal of physiology*, 592(2), 261–268. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.255661>

68. Albillos, A., Artalejo, A. R., López, M. G., Gandía, L., García, A. G., & Carbone, E. (1994). Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 477(Pt 2), 197–213. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1994.sp020184>
69. Hernández-Guijo, J. M., de Pascual, R., Garcia, A. G., & Gandia, L. (1998). Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflügers Archiv / European Journal of Physiology*, 436, 75–82. <https://doi.org/10.1007/s004240050606>
70. Gandia, L., Borges, R., Albillos, A., & Garcia, A. G. (1995). Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflügers Archiv / European Journal of Physiology*, 430, 55–63. <https://doi.org/10.1007/BF00373839>
71. Kitamura, N., Ohta, T., Ito, S., & Nakazato, Y. (1997). Calcium channel subtypes in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflügers Archiv / European Journal of Physiology*, 434, 179–187. <https://doi.org/10.1007/s004240050381>
72. Lopez, M. G., Villarroya, M., Lara, B., Martinez-Sierra, R., Albillos, A., Garcia, A. G., & Gandia, L. (1994b). Q- and L-type Ca²⁺ channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Letters*, 349, 331–337. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00696-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00696-2)
73. Gandia, L., Mayorgas, I., Michelena, P., Cuchillo, I., de Pascual, R., Abad, F., Novalbos, J. M., Larranaga, E., & Garcia, A. G. (1998). Human adrenal chromaffin cell calcium channels: Drastic current facilitation in cell clusters, but not in isolated cells. *Pflügers Archiv / European Journal of Physiology*, 436, 696–704. <https://doi.org/10.1007/s004240050691>
74. Llinás, R., Sugimori, M., Lin, J. W., & Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1689–1693. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1689>
75. Fernández, A., García-de Diego, A.M., Gandía, L., García, A.G., Hernandez-Guijo, J.M. (2022). An Integral View on Calcium Channels and Transporters Shaping Calcium and Exocytotic Signals in Chromaffin Cells. In: Zamponi, G.W., Weiss, N. (eds) Voltage-Gated Calcium Channels. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08881-0_14
76. Berridge M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1), 13–26. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80510-3)
77. Harada, K., Matsuoka, H., Sata, T., Warashina, A., & Inoue, M. (2011). Identification and role of muscarinic receptor subtypes expressed in rat adrenal medullary cells. *Journal of pharmacological sciences*, 117(4), 253–264. <https://doi.org/10.1254/jphs.11125fp>
78. Sala, F., Nistri, A., & Criado, M. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 192(2), 203–212. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01804.x>
79. Babcock, D. F., Herrington, J., Goodwin, P. C., Park, Y. B., & Hille, B. (1997). Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network. *The Journal of cell biology*, 136(4), 833–844.

<https://doi.org/10.1083/jcb.136.4.833>

80. Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibáñez, I., Albillos, A., García, A. G., García-Sancho, J., & Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nature cell biology*, 2(2), 57–61. <https://doi.org/10.1038/35000001>
81. Duchen M. R. (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *The Journal of physiology*, 529 Pt 1(Pt 1), 57–68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00057.x>
82. Finkel, T., Menazza, S., Holmström, K. M., Parks, R. J., Liu, J., Sun, J., Liu, J., Pan, X., & Murphy, E. (2015). The ins and outs of mitochondrial calcium. *Circulation research*, 116(11), 1810–1819. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305484>
83. Carafoli E. (1979). The calcium cycle of mitochondria. *FEBS letters*, 104(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81073-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81073-x)
84. Romero-Garcia, S., & Prado-Garcia, H. (2019). Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). *International journal of oncology*, 54(4), 1155–1167. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4696>
85. García-Sancho, J., de Diego, A. M., & García, A. G. (2012). Mitochondria and chromaffin cell function. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 464(1), 33–41. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1074-2>
86. Barry, V. A., & Cheek, T. R. (1994). A caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ store can act as a Ca²⁺ source and a Ca²⁺ sink in PC12 cells. *The Biochemical journal*, 300 (Pt 2)(Pt 2), 589–597. <https://doi.org/10.1042/bj3000589>
87. Friel DD, Tsien RW (1992) A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ store in bullfrog sympathetic neurones modulates effects of Ca²⁺ entry on [Ca²⁺]_i. *J Physiol* 450:217–246. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019125>
88. Raffaello, A., Mammucari, C., Gherardi, G., & Rizzuto, R. (2016). Calcium at the Center of Cell Signaling: Interplay between Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Lysosomes. *Trends in biochemical sciences*, 41(12), 1035–1049. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.001>
89. Alés, E., Fuentealba, J., García, A. G., & López, M. G. (2005). Depolarization evokes different patterns of calcium signals and exocytosis in bovine and mouse chromaffin cells: the role of mitochondria. *The European journal of neuroscience*, 21(1), 142–150. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03861.x>
90. Giovannucci, D. R., Hlubek, M. D., & Stuenkel, E. L. (1999). Mitochondria regulate the Ca(2+)-exocytosis relationship of bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(21), 9261–9270. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-21-09261.1999>
91. Martínez-Ramírez C, Gil-Gómez I, de Diego AMG, García AG (2021) Acute reversible SERCA

- blockade facilitates or blocks exocytosis, respectively in mouse or bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* 473(2):273–286. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02483-1>
92. Hernández-Cruz A (2021) Reversible interruption of ER Ca²⁺ uptake inversely affects ACh-elicited exocytosis in mouse and bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch* 473(2):133–134. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02485-z>
93. Seidler, N. W., Jona, I., Vegh, M., & Martonosi, A. (1989). Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 264(30), 17816–17823.
94. Demaurex, N., Lew, D. P., & Krause, K. H. (1992). Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca²⁺ stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *The Journal of biological chemistry*, 267(4), 2318–2324. PMID: 1531138
95. Morales-Villegas, E. C., Yarleque, C., & Almeida, M. L. (2023). Management of hypertension and dyslipidemia in Mexico: Evidence, gaps, and approach. *Archivos de cardiología de México*, 93(1), 077–087. <https://doi.org/10.24875/ACM.21000330>
96. Hall, J. E., Granger, J. P., do Carmo, J. M., da Silva, A. A., Dubinion, J., George, E., Hamza, S., Speed, J., & Hall, M. E. (2012). Hypertension: physiology and pathophysiology. *Comprehensive Physiology*, 2(4), 2393–2442. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110058>
97. Chobanian, A. V., Bakris, G. L., Black, H. R., Cushman, W. C., Green, L. A., Izzo, J. L., Jr, Jones, D. W., Materson, B. J., Oparil, S., Wright, J. T., Jr, Roccella, E. J., Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute, & National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee (2003). Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 42(6), 1206–1252. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000107251.49515.c2>
98. 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* 69:714–721. <https://doi.org/10.1161/01.RES.69.3.714> PMID: 1873866
99. Okamoto K, Aoki K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282–293. <https://doi.org/10.1253/jcj.27.282>
100. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988]
101. Pak C. H. (1981). Plasma adrenaline and noradrenaline concentrations of the spontaneously hypertensive rat. *Japanese heart journal*, 22(6), 987–995. <https://doi.org/10.1536/ihj.22.987>
102. Jablonskis, L. T., & Howe, P. R. (1994). Elevated plasma adrenaline in spontaneously hypertensive rats. *Blood pressure*, 3(1-2), 106–111. <https://doi.org/10.3109/08037059409101529>

103. Lim, D. Y., Jang, S. J., & Park, D. G. (2002). Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Autonomic & autacoid pharmacology*, 22(4), 225–232. <https://doi.org/10.1046/j.1474-8673.2002.00264.x>
104. Segura-Chama, P., López-Bistrain, P., Pérez-Armendáriz, E. M., Jiménez-Pérez, N., Millán-Aldaco, D., & Hernández-Cruz, A. (2015). Enhanced Ca(2+)-induced Ca(2+) release from intracellular stores contributes to catecholamine hypersecretion in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 467(11), 2307–2323. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1702-8>
105. Srinivasan A. V. (2019). Propranolol: A 50-Year Historical Perspective. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 22(1), 21–26. https://doi.org/10.4103/aian.AIAN_201_18
106. Motiejunaite, J., Amar, L., & Vidal-Petiot, E. (2021). Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Annales d'endocrinologie*, 82(3-4), 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2020.03.012>
107. Alejandro-García, T., Segura-Chama, P., Parada-Parra, O. J., Millán-Aldaco, D., & Hernández-Cruz, A. (2023). Calcium Imaging and Amperometric Recording in Cultured Chromaffin Cells and Adrenal Slices from Normotensive, Wistar Kyoto Rats and Spontaneously Hypertensive Rats. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2565, 129–151. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2671-9_10
108. Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., Near, J. A., Diliberto, E. J., Jr, & Viveros, O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10754–10758. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10754>
109. Edelstein AD, Tsuchida MA, Amodaj N, Pinkard H, Vale RD, Stuurman N (2014) Advanced methods of microscope control using µManager software. *J Biol Methods* 1(2):e10. <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.36>
110. Segura, F., Brioso, M. A., Gómez, J. F., Machado, J. D., & Borges, R. (2000). Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *Journal of neuroscience methods*, 103(2), 151–156. [https://doi.org/10.1016/s0165-0270\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/s0165-0270(00)00309-5)
111. Cuchillo-Ibáñez, I., Olivares, R., Aldea, M., Villarroya, M., Arroyo, G., Fuentealba, J., García, A. G., & Albillos, A. (2002). Acetylcholine and potassium elicit different patterns of exocytosis in chromaffin cells when the intracellular calcium handling is disturbed. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 444(1-2), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0810-4>
112. Zaika, O. L., Pochynyuk, O. M., Kostyuk, P. G., Yavorskaya, E. N., & Lukyanetz, E. A. (2004). Acetylcholine-induced calcium signalling in adrenaline- and noradrenaline-containing adrenal chromaffin cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 424(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.01.012>

113. Chow, R. H., Klingauf, J., Heinemann, C., Zucker, R. S., & Neher, E. (1996). Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells. *Neuron*, *16*(2), 369–376. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80054-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80054-9)
114. Segura-Chama, P., Hernández, A., Jiménez-Pérez, N., Alejandre-García, T., Rivera-Cerecedo, C. V., Hernández-Guijo, J., & Hernández-Cruz, A. (2010). Comparison of Ca²⁺ currents of chromaffin cells from normotensive Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Cellular and molecular neurobiology*, *30*(8), 1243–1250. <https://doi.org/10.1007/s10571-010-9566-0>
115. Alonso, M. T., Barrero, M. J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., García, A. G., García-Sancho, J., Montero, M., & Alvarez, J. (1999). Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *The Journal of cell biology*, *144*(2), 241–254. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.241>
116. Rigual, R., Montero, M., Rico, A. J., Prieto-Lloret, J., Alonso, M. T., & Alvarez, J. (2002). Modulation of secretion by the endoplasmic reticulum in mouse chromaffin cells. *The European journal of neuroscience*, *16*(9), 1690–1696. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.11-2.02244.x>
117. Wu, P. C., Fann, M. J., & Kao, L. S. (2010). Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in mouse adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, *112*(5), 1210–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06533.x>
118. Peña Del Castillo, J. G., Segura-Chama, P., Rincón-Heredia, R., Millán-Aldaco, D., Giménez-Molina, Y., Villanueva, J., Gutiérrez, L. M., & Hernández-Cruz, A. (2021). Development of the hypersecretory phenotype in the population of adrenal chromaffin cells from prehypertensive SHR. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, *473*(11), 1775–1793. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02614-2>
119. Marengo, F. D., & Cárdenas, A. M. (2018). How does the stimulus define exocytosis in adrenal chromaffin cells? *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, *470*(1), 155–167. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2052-5>
120. Álvarez, Y. D., Belingheri, A. V., Perez Bay, A. E., Javis, S. E., Tedford, H. W., Zamponi, G., & Marengo, F. D. (2013). The immediately releasable pool of mouse chromaffin cell vesicles is coupled to P/Q-type calcium channels via the synaptic protein interaction site. *PLoS one*, *8*(1), e54846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054846>
121. Voets, T., Neher, E., & Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, *23*(3), 607–615. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80812-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80812-0)
122. Stevens, D. R., Schirra, C., Becherer, U., & Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in synaptic neuroscience*, *3*, 2. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2011.00002>
123. Kumar S, Suleski M, Craig JM, Kasprovicz AE, Sanderford M, Li M, Stecher G, Hedges SB

- (2022) TimeTree 5: an expanded resource for species divergence times. *Mol Biol Evol* 39(8), msac174. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac174>
124. Alonso, M. T., Chamero, P., Villalobos, C., & García-Sancho, J. (2003). Fura-2 antagonises calcium-induced calcium release. *Cell calcium*, 33(1), 27–35. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(02\)00179-3](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(02)00179-3)
125. Hernández-Cruz, A., Escobar, A. L., & Jiménez, N. (1997). Ca(2+)-induced Ca2+ release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the rate of rise of trigger Ca2+. *The Journal of general physiology*, 109(2), 147–167. <https://doi.org/10.1085/jgp.109.2.147>
126. Lee, J. S., Greco, L., Migirov, A., Li, Y., Gerdes, A. M., & Zhang, Y. (2020). Chronic Dantrolene Treatment Does Not Affect Hypertension, but Attenuates Sympathetic Stimulation Enhanced Atrial Fibrillation Inducibility in SHR. *American journal of hypertension*, 33(5), 407–413. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpaa021>
127. Fossum, E., Olsen, M. H., Høiegggen, A., Wachtell, K., Reims, H. M., Ibsen, H., Julius, S., & Kjeldsen, S. E. (2004). Long-term plasma catecholamines in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy treated with losartan or atenolol: ICARUS, a LIFE substudy. *Journal of human hypertension*, 18(6), 375–380. <https://doi.org/10.1038/sj.jhh.1001712>
128. DeQuattro V, Chan S. (1972). Raised plasma-catecholamines in some patients with primary hypertension. *Lancet*; I: 806–809.
129. Egan, B., Panis, R., Hinderliter, A., Schork, N., & Julius, S. (1987). Mechanism of increased alpha adrenergic vasoconstriction in human essential hypertension. *The Journal of clinical investigation*, 80(3), 812–817. <https://doi.org/10.1172/JCI113138>
130. Hjemdahl P. (1988). Plasma catecholamines as markers for sympatho-adrenal activity in human primary hypertension. *Pharmacology & toxicology*, 63 Suppl 1, 27–31. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1988.tb02034.x>
131. Julius, S., Schork, N., & Schork, A. (1988). Sympathetic hyperactivity in early stages of hypertension: the Ann Arbor data set. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 12 Suppl 3, S121–S129.
132. Kjeldsen, S. E., Schork, N. J., Leren, P., & Eide, I. K. (1989). Arterial plasma norepinephrine correlates to blood pressure in middle-aged men with sustained essential hypertension. *American heart journal*, 118(4), 775–781. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(89\)90592-9](https://doi.org/10.1016/0002-8703(89)90592-9)
133. Carretero, O. A., & Oparil, S. (2000). Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*, 101(3), 329–335. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.3.329>
134. Currie, G., Freel, E. M., Perry, C. G., & Dominiczak, A. F. (2012). Disorders of blood pressure regulation-role of catecholamine biosynthesis, release, and metabolism. *Current hypertension reports*, 14(1), 38–45. <https://doi.org/10.1007/s11906-011-0239-2>
135. DiBona G. F. (2013). Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertension (Dallas,*

- Tex.: 1979), 61(3), 556–560. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00633>
136. Floras J. S. (1992). Epinephrine and the genesis of hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.19.1.1>
137. Oparil, S., Zaman, M. A., & Calhoun, D. A. (2003). Pathogenesis of hypertension. *Annals of internal medicine*, 139(9), 761–776. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-139-9-200311040-00011>
138. Neher E. (2006). A comparison between exocytic control mechanisms in adrenal chromaffin cells and a glutamatergic synapse. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 453(3), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0143-9>
139. Aoki, K., Takikawa, K., & Hotta, K. (1973). Role of adrenal cortex and medulla in hypertension. *Nature: New biology*, 241(108), 122–123. <https://doi.org/10.1038/newbio241122a0>
140. Inomata, A., & Sasano, H. (2015). Practical approaches for evaluating adrenal toxicity in nonclinical safety assessment. *Journal of toxicologic pathology*, 28(3), 125–132. <https://doi.org/10.1293/tox.2015-0025>
141. Novalbos, J., Abad-Santos, F., Zapater, P., Alvarez, J., Alonso, M. T., Montero, M., & García, A. G. (1999). Novel antimigraineur dotarizine releases Ca²⁺ from caffeine-sensitive Ca²⁺ stores of chromaffin cells. *British journal of pharmacology*, 128(3), 621–626. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702853>
142. Finnegan, J. M., Borges, R., & Wightman, R. M. (1996). Comparison of cytosolic Ca²⁺ and exocytosis responses from single rat and bovine chromaffin cells. *Neuroscience*, 71(3), 833–843. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00459-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00459-9)
143. Goeger, D. E., Riley, R. T., Dorner, J. W., & Cole, R. J. (1988). Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca²⁺-transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochemical pharmacology*, 37(5), 978–981. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90195-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90195-5)
144. Miranda-Ferreira, R., de Pascual, R., de Diego, A. M., Caricati-Neto, A., Gandía, L., Jurkiewicz, A., & García, A. G. (2008). Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 324(2), 685–693. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.128819>
145. Miranda-Ferreira, R., de Pascual, R., Caricati-Neto, A., Gandía, L., Jurkiewicz, A., & García, A. G. (2009). Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 329(1), 231–240. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.147413>
146. Miranda-Ferreira, R., de Pascual, R., Smaili, S. S., Caricati-Neto, A., Gandía, L., García, A. G., & Jurkiewicz, A. (2010). Greater cytosolic and mitochondrial calcium transients in adrenal medullary slices of hypertensive, compared with normotensive rats. *European journal of pharmacology*, 636(1-3), 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.03.044>

147. Colomer, C., Desarménien, M. G., & Guérineau, N. C. (2009). Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: role of gap junction-mediated intercellular communication. *Molecular neurobiology*, *40*(1), 87–100. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8073-0>
148. Martin, A. O., Mathieu, M. N., Chevillard, C., & Guérineau, N. C. (2001). Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *21*(15), 5397–5405. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-15-05397.2001>
149. Colomer, C., Olivos Ore, L. A., Coutry, N., Mathieu, M. N., Arthaud, S., Fontanaud, P., Iankova, I., Macari, F., Thouënnon, E., Yon, L., Anouar, Y., & Guérineau, N. C. (2008). Functional remodeling of gap junction-mediated electrical communication between adrenal chromaffin cells in stressed rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(26), 6616–6626. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5597-07.2008>
150. Aunis, D., & Langley, K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta physiologica Scandinavica*, *167*(2), 89–97. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.1999.00580.x>
151. Aunis, D., & Bader, M. F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *The Journal of experimental biology*, *139*, 253–266. <https://doi.org/10.1242/jeb.139.1.253>
152. Augustine, G. J., & Neher, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*, *450*, 247–271. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019126>
153. Neher, E., & Zucker, R. S. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, *10*(1), 21–30. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90238-m](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90238-m)
154. von Rüden, L., & Neher, E. (1993). A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science (New York, N.Y.)*, *262*(5136), 1061–1065. <https://doi.org/10.1126/science.8235626>
155. Voets T. (2000). Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, *28*(2), 537–545. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)00131-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)00131-8)
156. Lipscombe, D., Madison, D. V., Poenie, M., Reuter, H., Tsien, R. W., & Tsien, R. Y. (1988). Imaging of cytosolic Ca²⁺ transients arising from Ca²⁺ stores and Ca²⁺ channels in sympathetic neurons. *Neuron*, *1*(5), 355–365. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90185-7)
157. Thayer, S. A., Sturek, M., & Miller, R. J. (1988). Measurement of neuronal Ca²⁺ transients using simultaneous microfluorimetry and electrophysiology. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, *412*(1-2), 216–223. <https://doi.org/10.1007/BF00583753>

158. Thayer, S. A., Hirning, L. D., & Miller, R. J. (1988). The role of caffeine-sensitive calcium stores in the regulation of the intracellular free calcium concentration in rat sympathetic neurons in vitro. *Molecular pharmacology*, 34(5), 664–673.
159. Thayer, S. A., Perney, T. M., & Miller, R. J. (1988). Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(11), 4089–4097. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-11-04089.1988>
160. Hernández-Cruz, A., Díaz-Muñoz, M., Gómez-Chavarín, M., Cañedo-Merino, R., Protti, D. A., Escobar, A. L., Sierralta, J., & Suárez-Isla, B. A. (1995). Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced Ca²⁺ mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons. *The European journal of neuroscience*, 7(8), 1684–1699. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00690.x>
161. Hua, S. Y., Nohmi, M., & Kuba, K. (1993). Characteristics of Ca²⁺ release induced by Ca²⁺ influx in cultured bullfrog sympathetic neurones. *The Journal of physiology*, 464, 245–272. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019633>
162. Llano, I., DiPolo, R., & Marty, A. (1994). Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje cells. *Neuron*, 12(3), 663–673. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90221-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90221-6)
163. Guérineau, N. C., Desarménien, M. G., Carabelli, V., & Carbone, E. (2012). Functional chromaffin cell plasticity in response to stress: focus on nicotinic, gap junction, and voltage-gated Ca²⁺ channels. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 48(2), 368–386. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9707-7>
164. Hernandez-Guijo, J. M., Maneu-Flores, V. E., Ruiz-Nuno, A., Villarroya, M., Garcia, A. G., & Gandia, L. (2001). Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(8), 2553–2560. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-08-02553.2001>
165. Brooksby, P., Levi, A. J., & Jones, J. V. (1993). Investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovascular research*, 27(7), 1268–1277. <https://doi.org/10.1093/cvr/27.7.1268>
166. Xu, T., Naraghi, M., Kang, H., & Neher, E. (1997). Kinetic studies of Ca²⁺ binding and Ca²⁺ clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophysical journal*, 73(1), 532–545. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78091-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78091-3)
167. Villalobos, C., Nuñez, L., Montero, M., García, A. G., Alonso, M. T., Chamero, P., Alvarez, J., & García-Sancho, J. (2002). Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(3), 343–353. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0630com>
168. Herrington, J., Park, Y. B., Babcock, D. F., & Hille, B. (1996). Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca²⁺ loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 16(1), 219–228.

[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80038-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80038-0)

169. Warashina A. (2006). Mode of mitochondrial Ca²⁺ clearance and its influence on secretory responses in stimulated chromaffin cells. *Cell calcium*, 39(1), 35–46.

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.09.001>

170. Berends, A. M. A., Eisenhofer, G., Fishbein, L., Horst-Schrivers, A. N. A. V. D., Kema, I. P., Links, T. P., Lenders, J. W. M., & Kerstens, M. N. (2019). Intricacies of the Molecular Machinery of Catecholamine Biosynthesis and Secretion by Chromaffin Cells of the Normal Adrenal Medulla and in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers*, 11(8), 1121.

<https://doi.org/10.3390/cancers11081121>

171. Plant T. D. (1988). Properties and calcium-dependent inactivation of calcium currents in cultured mouse pancreatic B-cells. *The Journal of physiology*, 404, 731–747.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017316>

172. Zhou, Z., & Neher, E. (1993). Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 469, 245–273.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019813>

173. Neher, E., & Augustine, G. J. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 450, 273–301.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019127>

174. Lara, B., López, M. G., Villarroja, M., Gandía, L., Cleeman, L., Morad, M., & García, A. G. (1997). A caffeine-sensitive Ca²⁺ store modulates K⁺-evoked secretion in chromaffin cells. *The American journal of physiology*, 272(4 Pt 1), C1211–C1221.

<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.4.C1211>

175. O'Sullivan, A. J., Cheek, T. R., Moreton, R. B., Berridge, M. J., & Burgoyne, R. D. (1989). Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *The EMBO journal*, 8(2), 401–411. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03391.x>

176. Heinemann, C., von Rüden, L., Chow, R. H., & Neher, E. (1993). A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 424(2), 105–112. <https://doi.org/10.1007/BF00374600>

177. Finnegan, J. M., & Wightman, R. M. (1995). Correlation of real-time catecholamine release and cytosolic Ca²⁺ at single bovine chromaffin cells. *The Journal of biological chemistry*, 270(10), 5353–5359. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.5353>

178. Tuluc, P., & Carbone, E. (2024). Excitation-secretion coupling in chromaffin cells of the adrenal gland: Where does calcium come from?. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 476(1), 3–4. <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02867-z>

179. Kim, K. T., & Westhead, E. W. (1989). Cellular responses to Ca²⁺ from extracellular and intracellular sources are different as shown by simultaneous measurements of cytosolic Ca²⁺ and secretion from bovine chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America*, 86(24), 9881–9885. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9881>
180. Cheek, T. R., Jackson, T. R., O'Sullivan, A. J., Moreton, R. B., Berridge, M. J., & Burgoyne, R. D. (1989). Simultaneous measurements of cytosolic calcium and secretion in single bovine adrenal chromaffin cells by fluorescent imaging of fura-2 in cocultured cells. *The Journal of cell biology*, 109(3), 1219–1227. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.3.1219>
181. Warashina, A., Fujiwara, N. & Shimoji, K. (1990). Bradykinin-induced calcium mobilization and catecholamine secretion in rat adrenal medullary cells. *Biomedical Research* 11, 219–229. <https://doi.org/10.2220/biomedres.11.219>
182. Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen. *Trends in biochemical sciences*, 23(1), 10–14. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01143-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01143-2)
183. Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., & Meldolesi, J. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological reviews*, 74(3), 595–636. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.595>
184. Bers, D. M., & Perez-Reyes, E. (1999). Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovascular research*, 42(2), 339–360. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00038-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00038-3)
185. Bers D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a>
186. Vitale, M. L., Seward, E. P., & Trifaró, J. M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, 14(2), 353–363. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90291-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90291-0)
187. Allbritton, N. L., & Meyer, T. (1993). Localized calcium spikes and propagating calcium waves. *Cell calcium*, 14(10), 691–697. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(93\)90095-n](https://doi.org/10.1016/0143-4160(93)90095-n)
188. Millard, P. J., Gross, D., Webb, W. W., & Fewtrell, C. (1988). Imaging asynchronous changes in intracellular Ca²⁺ in individual stimulated tumor mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(6), 1854–1858. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.6.1854>
189. Monck, J. R., Reynolds, E. E., Thomas, A. P., & Williamson, J. R. (1988). Novel kinetics of single cell Ca²⁺ transients in stimulated hepatocytes and A10 cells measured using fura-2 and fluorescent videomicroscopy. *The Journal of biological chemistry*, 263(10), 4569–4575.
190. Williamson, J. R., Cooper, R. H., Joseph, S. K., & Thomas, A. P. (1985). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as intracellular second messengers in liver. *The American journal of physiology*, 248(3 Pt 1), C203–C216. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1985.248.3.C203>
191. Joseph, S. K., Coll, K. E., Thomas, A. P., Rubin, R., & Williamson, J. R. (1985). The role of extracellular Ca²⁺ in the response of the hepatocyte to Ca²⁺-dependent hormones. *The Journal of biological chemistry*, 260(23), 12508–12515.

192. Albert, P. R., & Tashjian, A. H., Jr (1984). Relationship of thyrotropin-releasing hormone-induced spike and plateau phases in cytosolic free Ca²⁺ concentrations to hormone secretion. Selective blockade using ionomycin and nifedipine. *The Journal of biological chemistry*, 259(24), 15350–15363.
193. Marengo, F. D., & Monck, J. R. (2003). Spatial distribution of Ca²⁺ signals during repetitive depolarizing stimuli in adrenal chromaffin cells. *Biophysical journal*, 85(5), 3397–3417. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74759-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74759-6)
194. Inoue, M., Sakamoto, Y., Fujishiro, N., Imanaga, I., Ozaki, S., Prestwich, G. D., & Warashina, A. (2003). Homogeneous Ca²⁺ stores in rat adrenal chromaffin cells. *Cell calcium*, 33(1), 19–26. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(02\)00178-1](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(02)00178-1)
195. Rooney, E., & Meldolesi, J. (1996). The endoplasmic reticulum in PC12 cells. Evidence for a mosaic of domains differently specialized in Ca²⁺ handling. *The Journal of biological chemistry*, 271(46), 29304–29311. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.29304>
196. Pezzati, R., Bossi, M., Podini, P., Meldolesi, J., & Grohovaz, F. (1997). High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. Electron energy loss imaging analysis of quick frozen-freeze dried PC12 cells. *Molecular biology of the cell*, 8(8), 1501–1512. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.8.1501>
197. Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1998). The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function. *The Journal of cell biology*, 142(6), 1395–1398. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.6.1395>
198. Golovina, V. A., & Blaustein, M. P. (1997). Spatially and functionally distinct Ca²⁺ stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5306), 1643–1648. <https://doi.org/10.1126/science.275.5306.1643>
199. Poulsen, J. C., Caspersen, C., Mathiasen, D., East, J. M., Tunwell, R. E., Lai, F. A., Maeda, N., Mikoshiba, K., & Treiman, M. (1995). Thapsigargin-sensitive Ca²⁺-ATPases account for Ca²⁺ uptake to inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and caffeine-sensitive Ca²⁺ stores in adrenal chromaffin cells. *The Biochemical journal*, 307 (Pt 3)(Pt 3), 749–758. <https://doi.org/10.1042/bj3070749>
200. Burgoyne, R. D., Cheek, T. R., Morgan, A., O'Sullivan, A. J., Moreton, R. B., Berridge, M. J., Mata, A. M., Colyer, J., Lee, A. G., & East, J. M. (1989). Distribution of two distinct Ca²⁺-ATPase-like proteins and their relationships to the agonist-sensitive calcium store in adrenal chromaffin cells. *Nature*, 342(6245), 72–74. <https://doi.org/10.1038/342072a0>
201. Stauderman, K. A., McKinney, R. A., & Murawsky, M. M. (1991). The role of caffeine-sensitive Ca²⁺ stores in agonist- and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release from bovine adrenal chromaffin cells. *The Biochemical journal*, 278 (Pt 3) (Pt 3), 643–650. <https://doi.org/10.1042/bj2780643>
202. Plevin, R., & Boarder, M. R. (1988). Stimulation of formation of inositol phosphates in primary cultures of bovine adrenal chromaffin cells by angiotensin II, histamine, bradykinin,

and carbachol. *Journal of neurochemistry*, 51(2), 634–641. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb01085.x>

203. Purkiss, J., Murrin, R. A., Owen, P. J., & Boarder, M. R. (1991). Lack of phospholipase D activity in chromaffin cells: bradykinin-stimulated phosphatidic acid formation involves phospholipase C in chromaffin cells but phospholipase D in PC12 cells. *Journal of neurochemistry*, 57(3), 1084–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08262.x>

204. Owen, P. J., & Boarder, M. R. (1991). Influence of bradykinin on diacylglycerol and phosphatidic acid accumulation in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 57(3), 760–768. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08217.x>

205. Fasolato, C., Pandiella, A., Meldolesi, J., & Pozzan, T. (1988). Generation of inositol phosphates, cytosolic Ca²⁺, and ionic fluxes in PC12 cells treated with bradykinin. *The Journal of biological chemistry*, 263(33), 17350–17359.

206. Malgaroli, A., Fesce, R., & Meldolesi, J. (1990). Spontaneous [Ca²⁺]_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 Ca²⁺ store. *The Journal of biological chemistry*, 265(6), 3005–3008.

207. Cheek, T. R., O'Sullivan, A. J., Moreton, R. B., Berridge, M. J., & Burgoyne, R. D. (1990). The caffeine-sensitive Ca²⁺ store in bovine adrenal chromaffin cells; an examination of its role in triggering secretion and Ca²⁺ homeostasis. *FEBS letters*, 266(1-2), 91–95. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81514-o](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81514-o)

208. Sala, F., Nistri, A., & Criado, M. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 192(2), 203–212. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2007.01804.x>

209. Kasai, H., & Neher, E. (1992). Dihydropyridine-sensitive and omega-conotoxin-sensitive calcium channels in a mammalian neuroblastoma-glioma cell line. *The Journal of physiology*, 448, 161–188. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019035>

XII. Material suplementario

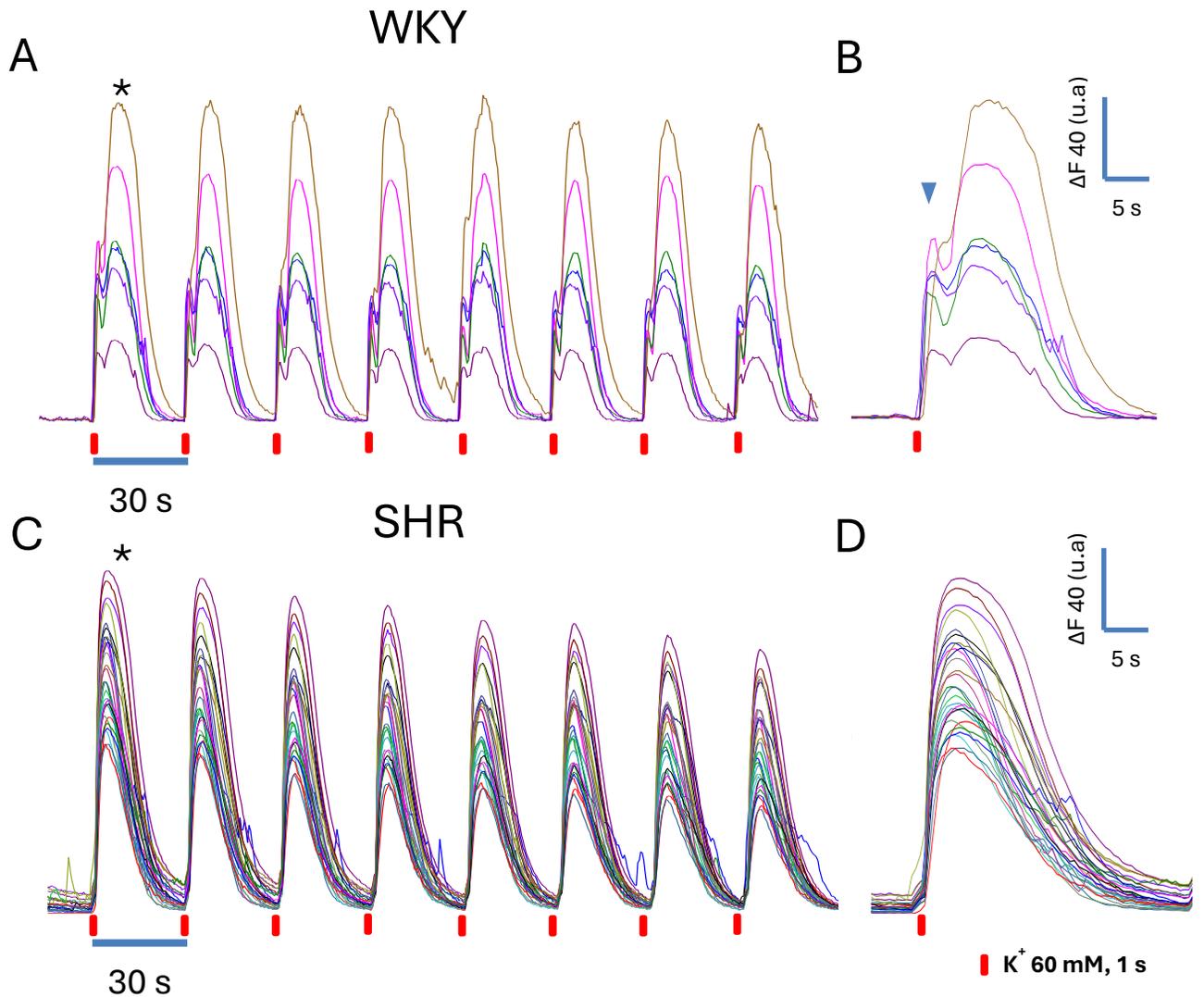


Figura S1. Registros representativos de $t-[Ca^{2+}]$ bifásicos y monofásicos en CCs de ratas WKY y SHR. A. Seis CCs de ratas WKY en un mismo campo visual fueron estimuladas con 8 pulsos despolarizantes de alto K^+ (1 s, 60 mM) cada 30 s. Cinco CCs del campo presentan $t-[Ca^{2+}]$ con un componente temprano rápido seguido de otro más lento. Una de las CCs responde con un $t-[Ca^{2+}]$ único (trazo café). B. Se muestran los $t-[Ca^{2+}]$ en respuesta al primer estímulo en A (asterisco) con mayor resolución temporal. La flecha azul señala el componente temprano de la señal de $[Ca^{2+}]$. C. Registro representativo de $t-[Ca^{2+}]$ con un solo componente de 25 CCs de ratas SHR en un campo visual que fueron estimuladas como en A. D. Se observan los $t-[Ca^{2+}]$ monofásicos en respuesta al primer estímulo en C (asterisco) tras aumentar la resolución del eje x.

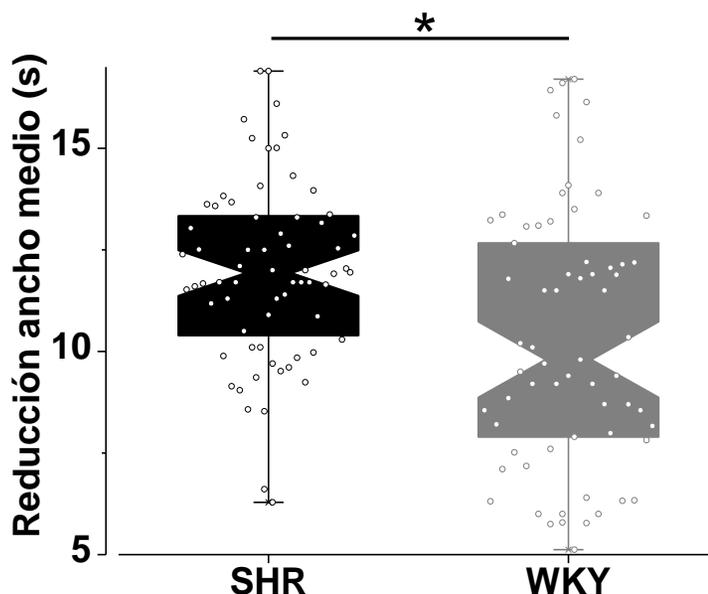


Figura S2. Reducción de la anchura media de los $t-[Ca^{2+}]_i$ de CCs de ratas SHR y WKY por CPA. Durante la estimulación repetitiva (P1 a P8), la aplicación de CPA durante los estímulos P3 a P5 tuvo una potencia significativamente mayor sobre la cinética de los $t-[Ca^{2+}]_i$ de las CCs de SHR que en las CCs normotensas WKY. La reducción de la duración del transitorio de $[Ca^{2+}]_i$ fue de 12.1 ± 0.3 s en CCs de SHR ($n = 68$ células) y de 10.3 ± 0.4 s en CCs de WKY ($n = 65$ células) (media \pm desviación estándar) cuando se evalúa la anchura media de la onda. El efecto del CPA es compatible con una mayor ganancia del mecanismo de CICR en las CCs de SHR. * p -valor < 0.05 .

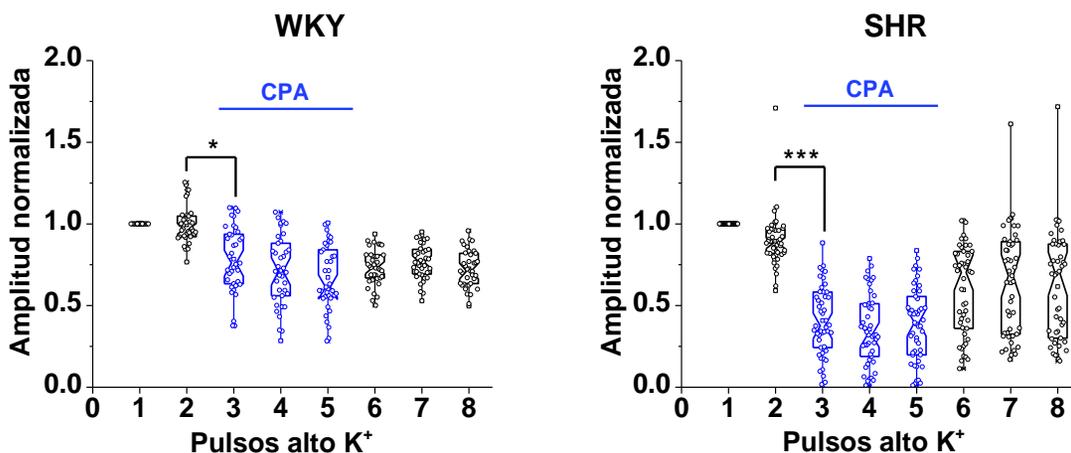


Figura S3. El CPA reduce la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]_i$ de CCs de ratas SHR y WKY. CCs de ratas WKY y SHR fueron estimuladas con 8 pulsos despolarizantes (P1 a P8). Se aplicó CPA ($10 \mu M$) al mismo tiempo que los estímulos P3 a P5 y se midió su efecto sobre la amplitud normalizada de los $t-[Ca^{2+}]_i$ en cada caso. La aplicación de CPA tiene una potencia significativamente mayor sobre la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]_i$ de CCs de SHR que sobre los $t-[Ca^{2+}]_i$ de CCs de WKY, lo que sugiere que un mecanismo de CICR más robusto en las células de SHR. Tras retirar el CPA, la amplitud de los $t-[Ca^{2+}]_i$ se recupera parcialmente. En este análisis se incluyeron CCs que presentaban $t-[Ca^{2+}]_i$ con un único componente. * p -valor < 0.05 . *** p -valor < 0.001 . $n = 47$ CCs de SHR y WKY.