



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA
CORRIENTE DE CALCIO DE CÉLULAS
CROMAFINES DE RATAS HIPERTENSAS SHR Y
NORMOTENSAS WKY**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

PEDRO DAVID SEGURA CHAMA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ**

Ciudad Universitaria 2012



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.

El siguiente trabajo se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Arturo Hernández Cruz en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Gracias al apoyo del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. A la beca otorgada por parte de CONACYT. A los siguientes proyectos: DGAPA-UNAM IN227910, CONACYT 79763 y 102085 y PROYECTO IMPULSA DE CÉLULAS TRONCALES, UNAM.

ABREVIATURAS

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1. El sistema simpatoadrenal	1
1.1 La respuesta al estrés	1
1.2 El sistema simpatoadrenal y la presión arterial	2
1.3 La hipertensión esencial	3
2. Generalidades de la glándula suprarrenal	4
2.1 Anatomía y función de la glándula suprarrenal	4
2.2 La corteza suprarrenal	5
2.3 La médula suprarrenal	6
2.4 Las células cromafines conforman la médula suprarrenal ,...	7
3. Generalidades de las catecolaminas	8
3.1 Síntesis de las catecolaminas	8
3.2 Efectos de las catecolaminas	8
3.3 Degradación de catecolaminas	9
4. Secreción de catecolaminas en células cromafines.....	10
4.1 Estimulación de la secreción	10
4.2 Excitabilidad de las células cromafines	11
4.3 Importancia del Ca ²⁺ en la secreción	13
5. Canales de calcio dependientes de voltaje	13
5.1 Estructura de los CCDV	13
5.2 Nomenclatura y clasificación de los CCDV	14
5.3 CCDV en células cromafines	16
6. Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y wistar kyoto (WKY)	19
6.1 Modelo animal de hipertension esencial.....	19
6.2 Características de las ratas SHR	20
6.3 Ratas WKY como control normotenso	21
II. ANTECEDENTES.....	21

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	28
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVOS	29
1.1 Objetivo general.....	29
1.2 Objetivos particulares.....	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. Ratas SHR y WKY.....	30
1.1 Monitoreo de la presión arterial.....	30
2. Obtención de las rebanadas de glándulas suprarrenales.....	32
3. Registros electrofisiológicos.....	33
3.1 Técnica de Patch-clamp: fijación de voltaje.....	33
3.2 Relación corriente-voltaje (I-V).....	35
3.3 Activación e inactivación dependiente de voltaje de la I _{Ca}	36
3.4 Cinética de cierre de los canales (desactivación).....	36
3.5 Inactivación de la I _{Ca} dependiente de Ca ²⁺	37
4. Extracción de RNAm y síntesis de DNAc.....	38
4.1 PCR en tiempo real.....	38
VII. RESULTADOS.....	40
Sección I. Comparación de la I_{Ca} en células cromafines	
de ratas WKY y SHR	40
1. Presión arterial en ratas SHR y WKY.....	40
2. I _{Ca} en células cromafines de glándula suprarrenal de ratas	
WKY y SHR.....	40
3. El componente transitorio de I _{Ca} no se observa en células	
cromafines de rata Wistar.....	42
4. Dependencia del voltaje en activación e inactivación de	
I _{Ca} en WKY y SHR.....	44
5. ¿El componente transitorio se debe a la activación de I _{Ca} tipo T?.....	46
6. Proporción de I _{Ca} tipo L en células cromafines de rata WKY y SHR.....	47

Sección II. Dilucidación del origen del componente transitorio de ICa	49
1. Determinación de la presencia o ausencia de ICa tipo T en WKY/SHR.....	49
2. ¿Es ICa tipo L la que participa en la activación del componente transitorio?.....	53
3. ¿La inactivación de la ICa en células cromafines de WKY/SHR es dependiente de Ca^{2+} ?.....	54
4. Identificación de la presencia de $Ca_v1.3_{42A}$ por PCR en tiempo real.....	56
5. Determinación de los subtipos de CCDV en células cromafines de WKY y SHR.....	58
VIII. DISCUSIÓN	60
IX. CONCLUSIONES	72
X. BIBLIOGRAFÍA	73

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
Ba²⁺	Ion bario
BBS	Solución salina con buffer de fosfatos
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
Ca²⁺	Ion calcio
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
Cd²⁺	Ion cadmio
COMT	Catecol-O-Metil-transferasa
DAG	Diacilglicerol
DNAC	Ácido desoxirribonucleico complementario
GΩ	Gigaohms
HEK	Línea celular de riñón de embrión humano
HVA	Alto voltaje de activación
ICa	Corriente de calcio
IK	Corriente de potasio
INa	Corriente de sodio
IP₃	Trifosfato de inositol
I-V	Relación corriente-voltaje
K⁺	Ion potasio
LVA	Bajo voltaje de activación
mAChRs	Receptores de acetilcolina muscarínicos

MAO	Oxidasa de monoaminas
MΩ	Megaohms
Na⁺	Ion sodio
nAChRs	Receptores de acetilcolina nicotínicos
NGF	Factor de crecimiento neural
Ni²⁺	Ion níquel
pA/pF	Densidad de corriente, picoAmperios/picoFaradios
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLC	Fosfolipasa C
PNMT	Feniletanolamina-N-Metil-transferasa
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
TEA	Tetraetilamonio
TTX	Tetrodotoxina
WKY	Cepa de rata Wistar Kyoto

RESUMEN.

La hipertensión esencial es una patología multifactorial de causas desconocidas y las ratas SHR son el modelo animal utilizado para investigar los mecanismos de la fisiopatología. El incremento de catecolaminas circulantes, se ha implicado en el origen y/o mantenimiento de la hipertensión esencial. Se ha demostrado que la simpatectomía en ratas SHR jóvenes reduce los niveles de hipertensión en la etapa adulta, pero la eliminación de la médula de la glándula suprarrenal en las ratas SHR simpatectomizadas previene el desarrollo de la hipertensión. Por otra parte, se ha reportado que la secreción de catecolaminas de glándulas suprarrenales intactas de ratas SHR es mayor que la de ratas normotensas WKY al ser estimuladas con acetilcolina o por alto K^+ . Durante la estimulación el incremento del Ca^{2+} intracelular es indispensable para que se lleve a cabo la secreción de catecolaminas. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) es decisiva para incrementar el Ca^{2+} intracelular, por lo que posiblemente alteraciones en la entrada de Ca^{2+} por estos canales podría explicar la hipersecreción de catecolaminas reportada de células cromafines de la médula suprarrenal de ratas SHR. En este trabajo evaluamos la corriente de calcio de células cromafines en rebanadas de glándulas suprarrenales de ratas hipertensas SHR y normotensas WKY.

Mediante la técnica de patch-clamp en fijación de voltaje en célula entera comprobamos que la I_{Ca} de células cromafines de ratas WKY y SHR presenta un componente transitorio que se activa e inactiva rápidamente durante voltajes negativos y uno sostenido que predomina en voltajes positivos. Demostramos que no existe diferencia significativa en la densidad de I_{Ca}, en la relación I-V, ni en la cinética de activación e inactivación dependiente de voltaje entre ambas cepas. No observamos I_{Ca} tipo T y determinamos que no hay diferencia en la contribución de los diferentes subtipos de CCDV (L, N, P-Q, R) a la I_{Ca} total. Importantemente, demostramos que el componente transitorio de la I_{Ca} se debe al reclutamiento de la variante $Ca_v1.3_{42A}$ del canal $Ca_v1.3$ ($\alpha 1D$) de inactivación rápida de Ca^{2+} y que la variante $Ca_v1.3_{42}$ de inactivación lenta no se expresa en células cromafines de ratas WKY y SHR.

Nuestros resultados sugieren que la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV no es diferente entre células cromafines de ratas WKY y SHR, al menos en etapas tempranas de la hipertensión, por lo tanto la hipersecreción de catecolaminas reportada de células cromafines no se puede explicar por alteraciones en los CCDV.

Por otra parte, es necesario dilucidar las implicaciones fisiológicas de la expresión atípica de $Ca_v1.3_{42A}$ y el déficit de $Ca_v1.3_{42}$ en ratas WKY y SHR; además de evaluar si esto ocurre únicamente en la médula suprarrenal o si este patrón de expresión sucede en otros tejidos. Es posible que estas diferencias permitan explicar en alguna medida las alteraciones funcionales o conductuales reportadas en ratas WKY y SHR, incluyendo la susceptibilidad a desarrollar hipertensión.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL SISTEMA SIMPATOADRENAL

1.1 LA RESPUESTA AL ESTRÉS

El sistema nervioso central (SNC) dirige la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA) por medio de zonas ubicadas en el hipotálamo, en el tronco encefálico y en la corteza cerebral. El SNA inerva el músculo liso, el músculo cardíaco y las glándulas de todo el organismo, modulando la actividad del sistema cardiovascular, respiratorio, urogenital y digestivo (Landsberg y Young, 1992).

La función fundamental del SNA es el control del equilibrio del medio interno y efectuar las respuestas ante estímulos externos e internos a través de sus dos subsistemas: el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso parasimpático (SNP). El SNS se encarga de preparar al individuo en defensa ante una situación de estrés o de peligro, mientras que el SNP se relaciona con funciones protectoras y conservadoras de energía (Genuth, 2004; Guyton y Hall, 2011).

Ante situaciones de alarma o de peligro, el SNS y la médula de la glándula suprarrenal funcionan conjuntamente para responder apropiadamente ante el estímulo. Al complejo anatómico-fisiológico conformado por ambos elementos se le denomina sistema simpatoadrenal (Landsberg y Young, 1992).

La manera en la que el sistema simpatoadrenal responde ante una situación de miedo, alarma, estrés o de conflicto, es mediante una descarga masiva de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) hacia el torrente sanguíneo disponiendo al organismo para la “respuesta de lucha o huida”, es decir, se enfrenta la situación o se huye inmediatamente de ella, esta respuesta fue estudiada por Walter Cannon en 1929. Los efectos del aumento de catecolaminas en la sangre genera respuestas altamente coordinadas y precisas caracterizadas por incrementar el pulso cardíaco, incrementa la contracción del miocardio aumentando la presión arterial; la irrigación sanguínea se distribuye principalmente hacia el músculo esquelético, la glucosa se moviliza del hígado y del músculo e incrementa en la circulación;

además, los bronquiolos y las pupilas se dilatan (Douglas, 1989; Hoffman y Taylor, 2001).

1.2 EL SISTEMA SIMPATOADRENAL Y LA PRESIÓN ARTERIAL

Gran parte de la importancia funcional del sistema simpatoadrenal radica en la respuesta aguda a diferentes estímulos; sin embargo, la respuesta sostenida ante estímulos crónicos también debe tener relevancia. Un ejemplo, es que ante una situación aguda de peligro, el aumento de catecolaminas en el torrente sanguíneo produce, entre otros efectos, un incremento momentáneo en la presión sanguínea; no obstante, se desconoce si el incremento sostenido en la actividad simpatoadrenal puede mantener los valores de presión arterial elevada, convirtiéndose a largo plazo en hipertensión. Existen reportes donde se han relacionado alteraciones en el sistema simpatoadrenal con el origen de la hipertensión esencial (Goldstein, 1983; Westfall y Westfall, 2007).

La hipertensión se considera como una fisiopatología de origen multifactorial poli-genética que involucra interacciones complejas entre mecanismos determinados genéticamente y factores medioambientales. La presión arterial se define como la presión hidrostática generada en el sistema arterial por el bombeo de la sangre del corazón contra la resistencia periférica de los vasos sanguíneos. Los parámetros de interés son la máxima o sistólica, presión generada durante la contracción del corazón; la mínima o diastólica, que ocurre justo antes de la siguiente contracción y el pulso de presión o diferencia entre sistólica y diastólica (Guyton y Hall, 2011). Los valores normales de presión arterial en el humano son: ~120/70 milímetros de mercurio (mm Hg) sistólica/diastólica; variaciones por debajo de los valores normales se consideran como hipotensión $\leq 90/50$ mm Hg, mientras que valores por arriba de los niveles normales $\geq 140/90$ mm Hg se considera como hipertensión (Guyton y Hall, 2011; Organización Mundial de la Salud).

La hipertensión arterial es la enfermedad cardiovascular más común con prevalencia mundial de aproximadamente el 30%, y es el mayor factor de riesgo para sufrir infarto cerebral, infarto cardiaco, cardiopatía y/o enfermedad renal. En México, como lo indica la Encuesta Nacional de Salud de 2006 el 33 % de la población adulta mayor a 20 años de edad presenta hipertensión.

1.3 LA HIPERTENSIÓN ESENCIAL

La hipertensión arterial se divide en función de si se conoce o no su génesis, denominándose hipertensión esencial o primaria cuando no se conoce la patogénesis o secundaria cuando su patogénesis corresponde a causas conocidas como puede ser coartación de la aorta, feocromocitoma, aldosteronismo primario, glomerulonefritis crónica, síndrome metabólico, hipertensión renovascular. Aproximadamente 90% de los pacientes con presión arterial elevada presentan hipertensión esencial; mientras que en el 10% restante la hipertensión es consecuencia de una alteración identificada (Cowley, 2006).

En 1953 Schroeder describió a la hipertensión esencial como “la condición que puede considerarse como una enfermedad vascular simple de causa desconocida o puede ser un grupo de enfermedades separadas con un resultado común y efectos secundarios comunes, cada uno de los cuales son etiológicamente diferentes, pero pato-genéticamente similares; producen incremento en la presión arterial” (Cowley, 2006).

Desafortunadamente no se ha podido encontrar una causa común de la hipertensión esencial, se considera una enfermedad compleja generada por la interacción entre múltiples factores, características poli-genéticas que son determinadas por diferentes variantes, interacciones gen-gen (epistasia) y el medio ambiente. Debido a estas razones es indispensable determinar cuales son las posibles anomalías fisiológicas que promueven el incremento de la presión arterial (Cowley, 2006).

En los mamíferos, la activación del sistema simpatoadrenal representa un mecanismo que ayuda a sobrellevar situaciones estresantes. En respuesta al estrés, las catecolaminas son de los primeros mediadores en ser secretados al torrente sanguíneo, estas hormonas de estrés ejercen múltiples acciones, en particular en el sistema cardiovascular. Dirigen el ajuste de presión sanguínea y del ritmo cardiaco, así como del metabolismo energético habilitando al organismo a responder ante una amenaza para la supervivencia (Landsberg y Young, 1992). Sin embargo, hasta el momento no es del todo claro si

situaciones de estrés crónico promueven alteraciones que generen hipertensión arterial.

Se ha sugerido que alteraciones a nivel del sistema renina-angiotensina, sistema nervioso simpático y sistema simpatoadrenal intervienen de manera importante en la patogénesis de la hipertensión esencial (Antonaccio y Kerwin, 1981; Goldstein, 1983; Grassi y cols, 1998); no obstante, la manera en la que participan no es del todo clara.

Como ya se mencionó, anomalías en el sistema simpatoadrenal se han relacionado con la hipertensión esencial, especialmente el incremento de catecolaminas circulantes (Goldstein, 1983). Este trabajo se enfoca en un componente del sistema simpatoadrenal, las células cromafines de la médula de la glándula suprarrenal que liberan catecolaminas al torrente sanguíneo y que pueden ser consideradas como un elemento importante en el origen y/o mantenimiento de la hipertensión esencial.

2. GENERALIDADES DE LA GLÁNDULA SUPRARRENAL

2.1 ANATOMÍA Y FUNCIÓN DE LA GLÁNDULA SUPRARRENAL

Las glándulas suprarrenales son dos pequeñas estructuras de forma piramidal ubicadas en el retroperitoneo sobre la parte superior de cada riñón (figura 1) y conforman junto con el SNS el sistema simpatoadrenal (Landsberg y Young, 1992; Guyton y Hall, 2011). En los mamíferos, la glándula adrenal está compuesta por dos partes diferenciadas anatómica y funcionalmente, la corteza y la médula (figura 1). La glándula está envuelta por una cápsula de tejido conectivo que la mantiene adherida al riñón, además está recubierta por tejido adiposo y se considera que presenta una de las tasas más altas de flujo sanguíneo por gramo de tejido (Genuth; 2004).

La función de la glándula suprarrenal es proteger al organismo contra el estrés. En 1929 Walter Cannon propuso que la médula responde ante situaciones de estrés agudo manifestándose la respuesta de “lucha o huida” que prepara al organismo para responder al agente estresante; por otra parte, entre 1930 y 1940 Hans Selye propuso que la corteza responde ante situaciones de estrés crónico presentándose el síndrome de adaptación

general que consta de una primera fase “reacción de alarma” similar a la propuesta por Cannon; si la situación estresante se prolonga continúa una segunda fase “etapa de resistencia” o también conocida como etapa de adaptación; por último se da la etapa de “agotamiento” en la cual disminuye la etapa de resistencia e incrementa la vulnerabilidad a generar respuestas fisiopatológicas por estrés (Hauger y Dautzenberg, 2000). La hipertensión esencial podría considerarse como una patología donde probablemente las situaciones de estrés crónico intervengan en su origen y/o establecimiento.

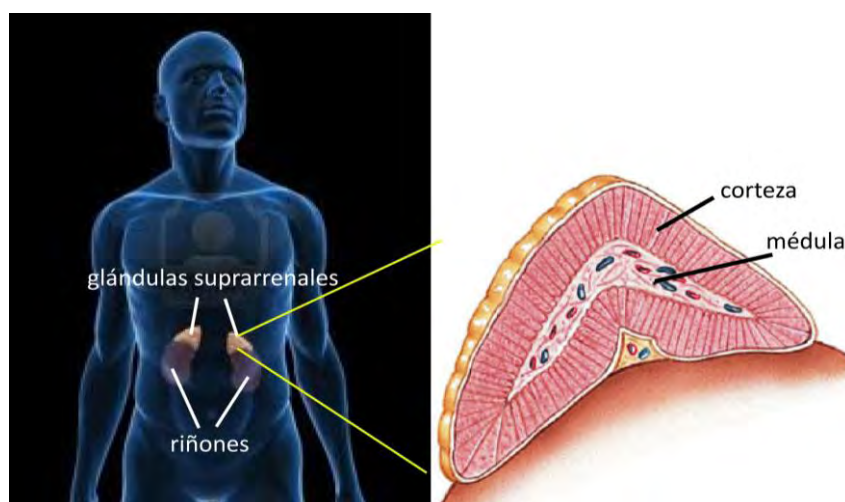


Figura 1. Las glándulas suprarrenales. Esquema que representa la ubicación de las glándulas suprarrenales en el humano. A la derecha se ilustra un corte de una de las glándulas donde se observa las dos estructuras que las componen, la corteza al exterior y la médula en la parte central.

2.2 LA CORTEZA SUPRARRENAL

La corteza suprarrenal conforma entre el 80 a 90 % de la glándula y se divide en tres estratos denominados, desde la parte más externa hacia el interior: 1) zona *glomerulosa*, cuyas células sintetizan y secretan mineralocorticoides (aldosterona) indispensable para conservar la homeostasis del agua y electrolitos, en particular al mantener un balance en el sodio y potasio extracelular, así como controlar el volumen del fluido extracelular. 2) zona *fasciculata*, cuyas células sintetizan y secretan glucocorticoides (cortisol y corticosterona) necesarios para mantener respuesta a estrés prolongado y contener reacciones de inflamación, importantemente participan en el

metabolismo de carbohidratos, principalmente la glucosa y también en el metabolismo de proteínas. 3) zona *reticularis*, cuyas células sintetizan y secretan pequeñas cantidades de andrógenos y estrógenos que contribuyen al establecimiento y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios (Guyton y Hall, 2011).

Se considera que tanto los mineralocorticoides como los glucocorticoides son indispensables para la vida, debido a que la deficiencia de estas hormonas adrenocorticales puede poner en serio riesgo de descompensación completa al individuo (Landsberg y Young, 1992; Guyton y Hall, 2011; Verdugo, 2005).

2.3 LA MÉDULA SUPRARRENAL

La médula suprarrenal conforma entre el 10 y 20 % de la glándula, se conforma en su mayoría de células cromafines organizadas en pequeños cordones o cúmulos que son rodeados por nervios, tejido conectivo y vasos sanguíneos; también hay una pequeña proporción de células ganglionares que se pueden encontrar solas o intercaladas entre los cúmulos, además de células de soporte que generalmente se pueden encontrar en la periferia de los cúmulos (Perlman y Chalfie, 1977; Kajiwara y cols, 1997; Barbara y cols, 1998). La médula se considera como un ganglio simpático modificado cuyos cuerpos celulares no inervan tejido alguno sino que, en respuesta a diversos estímulos vierten sus productos de secreción por medio de exocitosis al torrente circulatorio y por lo tanto se considera que funcionan como células endocrinas más que como células nerviosas, (Landsberg y Young, 1992; Kaplan, 1992; Genuth, 2004).

Las dos hormonas principales de la médula suprarrenal son la adrenalina y noradrenalina, también denominadas epinefrina y norepinefrina, respectivamente. A diferencia de las hormonas adrenocorticales, las medulares no son esenciales para la vida, pero sí para la respuesta a situaciones de alarma (Cannon, 1929; Douglas, 1968; Kaplan, 1992).

Las células cromafines que forman la médula suprarrenal son controladas a través de las terminales nerviosas preganglionares colinérgicas del SNS provenientes de los nervios esplácnicos originados entre los

segmentos torácicos (T-3) y lumbares (L-3) de la médula espinal (Landsberg y Young, 1992). Ésta inervación penetra hacia la médula formando haces, que en su interior se ramifican y forman al menos tres contactos sinápticos en de cada célula cromafín (Kajiwara y cols, 1997). El mediador químico preganglionar que estimula la secreción de catecolaminas de las células cromafines es la acetilcolina (ACh, por su nombre en inglés AcetylCholine) liberada de las terminales nerviosas. (Coupland, 1968; Perlman y Chalfie, 1977)

2.4 LAS CÉLULAS CROMAFINES CONFORMAN LA MÉDULA SUPRARRENAL

Las células cromafines (del griego *chroma* = color y del latín *affinis* = afín) se denominan así por la alta afinidad que tienen sus gránulos para teñirse de color café al oxidarse las catecolaminas almacenadas con sales de cromo (Coupland, 1968). Embriológicamente estas células derivan del neuroectodermo (Landsberg y Young, 1992; Guyton y Hall, 2011). Debido a la catecolamina que sintetizan, almacenan y secretan se clasifican en adrenérgicas entre 80-85 % y noradrenérgicas entre 15-20 % (Hillarp y Hokfelt 1953; Coupland y cols., 1964). La diferencia bioquímica entre ambos tipos se debe a la presencia de la enzima feniletanolamina N metil transferasa (PNMT, por sus siglas en inglés Phenylethanolamine N Metyl Transferase) en las células adrenérgicas, ésta enzima convierte la noradrenalina en adrenalina (Perlman y Chalfie, 1977).

Morfológicamente las células cromafines se diferencian por el tamaño de sus gránulos de secreción que pueden medir entre 50 a 350 nm de diámetro en las adrenérgicas con moderada densidad en su núcleo al visualizarlos bajo el microscopio electrónico, mientras que las noradrenérgicas presentan gránulos entre 185 a 495 nm de diámetro con núcleos con mayor densidad (Díaz-Flores y cols, 2008). La importancia de los gránulos reside en su función de almacenamiento y liberación de catecolaminas. (Coupland, 1989; Díaz-Flores y cols, 2008). Además de almacenar catecolaminas, los gránulos de las células cromafines almacenan péptidos opioides como metionina encefalina y leucina encefalina (North y Egan, 1983; Viveros y cols, 1979), cromograninas A y B,

secretograninas (Kataoka y cols, 1985), trifosfato de adenosina (ATP), calcio (Winkler y Westhead, 1980), los cuales son co-liberados con las catecolaminas.

3. GENERALIDADES DE LAS CATECOLAMINAS

3.1 SÍNTESIS DE LAS CATECOLAMINAS

La noradrenalina y adrenalina son moléculas derivadas de L-tirosina, este aminoácido proviene de la dieta o de la transformación de la fenilalanina en el hígado. Esta molécula se cataliza en el citoplasma de las células cromafines por la enzima tirosina hidroxilasa para obtener dihidroxifenilalanina (L-Dopa). La dopa descarboxilasa es la enzima que cataliza en el citoplasma a la L-Dopa en dopamina. La dopamina se cataliza por la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que convierte a la dopamina en noradrenalina y este proceso ocurre dentro de los gránulos de las células cromafines. Finalmente, la adrenalina se sintetiza a partir de la noradrenalina por la acción de la enzima PNMT, esta enzima se encuentra en el citoplasma de las células que contienen adrenalina (Guyton y Hall, 2011).

3.2 EFECTOS DE LAS CATECOLAMINAS

Los estímulos que promueven la secreción de catecolaminas pueden provenir de un incremento de la actividad de los nervios esplácnicos generada por situaciones de miedo, ansiedad, hipoglucemia, hipotensión o hipotermia; o a partir de estímulos químicos por vía hemática por sustancias como la histamina y la bradisinina que son liberadas en situaciones de alergia, o la angiotensina II liberada en situaciones de hipotensión (Douglas, 1968; Kaplan, 1992; Landsberg y Young, 1992; Verdugo, 2005).

Las catecolaminas liberadas por los distintos estímulos pueden actuar en diferentes órganos blanco. Los efectos biológicos de las catecolaminas son mediados por los receptores adrenérgicos, de los cuales existen dos familias, α y β . La familia de los receptores α son activados de manera no selectiva por adrenalina y noradrenalina y básicamente regulan la vasoconstricción, mientras

que los receptores β regulan la estimulación cardíaca, la broncodilatación y la vasodilatación. (Landsberg y Young, 1992; Grimaldo, 1997; Verdugo, 2005; Guyton y Hall, 2011).

Los efectos del incremento de catecolaminas en sangre se pueden resumir en: 1) incrementan la fuerza cardíaca aumentando la presión sanguínea; 2) promuevan la broncodilatación, provocando el aumento en la ventilación; 3) desvian la sangre de la región esplácnica y de la piel hacia el músculo y 4) movilizan glucosa y ácidos grasos libres al plasma como fuente de energía (Verdugo, 2005).

Los niveles de noradrenalina en plasma en humano se encuentran generalmente en el rango de 0.6 a 2.0 nmol/L (100 a 350 pg/ml), la noradrenalina en plasma proviene principalmente de las terminales nerviosas del sistema nervioso simpático (Cryer y cols, 1974). Mientras que la adrenalina en plasma proviene en su mayoría de la médula de la glándula suprarrenal y en algunas ocasiones por las terminales nerviosas del SNS, la concentración basal de adrenalina oscila entre 100 a 275 pmol/L (20 a 50 pg/ml; Cryer y cols, 1974).

La secreción de catecolaminas inducidas por cualquier estímulo cesa al cabo de unos minutos aunque el estímulo se mantenga, este fenómeno se interpreta como una protección del organismo frente a una liberación excesiva de catecolaminas que puede ser potencialmente letal (Landsberg y Young, 1992; García y cols, 2006; Guyton y Hall, 2011).

3.3 DEGRADACIÓN DE CATECOLAMINAS

Los efectos biológicos de las catecolaminas son terminados rápidamente por la acción de la oxidasa de monoaminas (MAO) o por la catecol O-metil transferasa (COMT). Una pequeña proporción de catecolaminas se considera que es excretada por el hígado a través de la bilis. Las catecolaminas no degradadas así como los metabolitos de catecolaminas son excretados por medio de la orina (Cryer y cols, 1974; Landsberg y Young, 1992). En el caso de las catecolaminas liberadas al torrente sanguíneo presentan una vida media mayor, por lo que sus efectos se mantienen durante 1 o 2 minutos después de haber sido liberadas (Guyton y Hall, 2011).

4. SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS

4.1 ESTIMULACIÓN DE LA SECRECIÓN

En base a experimentos realizados en glándulas adrenales de gato, se determinó que la secreción de catecolaminas adrenales ocurre porque la ACh estimula a las células cromafines e induce la secreción (Douglas y Rubin, 1961a), la secreción es un evento que depende de la presencia calcio extracelular (Douglas y Rubin, 1961b); además, la secreción es un proceso acompañado del incremento de calcio en el interior celular (Douglas y Poisner, 1962). Con base en estos experimentos en adrenales y en otros sistemas de secreción fue que en 1968 William Douglas acuñó el término acople estímulo-secreción para la secreción hormonal y de neurotransmisores. El ión calcio (Ca^{2+}) se considera como el agente intermediario entre el estímulo y la secreción (Douglas, 1968).

Las células cromafines presentan una gran variedad de canales iónicos, los cuales son proteínas integrales de membrana que forman poros para conducir iones hacia adentro o fuera de la célula, tienen selectividad iónica y pueden ser activados por distintos estímulos: mecánicos, eléctricos o por ligando. Las células cromafines presentan canales que se activan por variaciones en el voltaje de membrana, canales de potasio (K^+), canales de sodio (Na^+) y canales de calcio (Ca^{2+}) (Schlegel y Mollard, 1995).

Cuando las células se encuentran en reposo (sin estimulación) la diferencia en la distribución de iones dentro y fuera mantiene una polaridad, el interior celular es negativo respecto del medio extracelular (-40 a -65 mV en las células cromafines). Durante la estimulación fisiológica para la liberación de catecolaminas de las células cromafines, la ACh liberada de las terminales nerviosas simpáticas preganglionares derivadas del nervio esplácnico activa dos clases de receptores de la membrana celular: receptores nicotínicos (nAChRs) y receptores muscarínicos (mAChRs) (Coupland, 1989).

Los nAChRs son canales catiónicos no selectivos que se activan por la unión de ligando (ACh) aumentando la permeabilidad al Na^+ , Ca^{2+} y K^+ , aunque se considera que solo el 2-4 % de la corriente de Ca^{2+} (ICa) total en una célula

cromafin pasa a través de los nAChRs (Zhou y Neher, 1993). El cambio en la permeabilidad de los iones induce un cambio en la polaridad de la célula (despolarización), si la despolarización alcanza o sobrepasa el umbral del disparo del potencial de acción se generan uno o más potenciales de acción (Fenwick y cols, 1982; Kidokoro y Ritchie, 1980; Kidokoro y cols, 1982). El potencial de acción es un cambio momentáneo en el voltaje de la célula en el cual se alcanzan valores cercanos a los +30 mV y regresa al voltaje de reposo (-45 -65 mV) en aproximadamente 10 ms.

Mientras se generan los potenciales de acción, se incrementa la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} debido a que durante las variaciones en el voltaje se activan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) y permiten el flujo de iones Ca^{2+} al interior celular, traduciéndose en un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) promoviendo la fusión de los gránulos que contienen a las catecolaminas con la membrana celular para liberar las moléculas almacenadas por el proceso de exocitosis (García y cols, 2006; de Diego y cols, 2008).

Por otra parte, la unión de ACh a los mAChR que son receptores transmembranales acoplados a proteínas G; promueve la activación de la fosfolipasa C (PLC) y se produce 1,4,5-Inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). La acumulación de IP_3 en el interior celular y su unión a los receptores de IP_3 presentes en el retículo endoplásmico produce la salida de Ca^{2+} del retículo hacia el citoplasma. Este aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por IP_3 se considera como un mecanismo que amplifica la despolarización inicial producida por los nAChRs (TerBush y cols, 1986; O'Sullivan y Burgoyne, 1989).

4.2 EXCITABILIDAD DE LAS CÉLULAS CROMAFINES

El potencial de acción de las células cromafines inicia cuando se despolariza la célula, alcanzando el umbral de disparo y promoviendo la activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje. Transitoriamente la célula se despolariza hasta llegar a un pico máximo alrededor de los +30 mV (Kidokoro y Ritchie, 1980; Artalejo, 1995; Hollins e Ikeda, 1996). En células cromafines fetales de rata existen también canales de calcio tipo T, que al activarse contribuyen a la despolarización inicial (Hollins e Ikeda, 1996), o

canales de Ca^{2+} tipo L de bajo umbral de activación, que también pueden iniciar la despolarización (Marcantoni y cols, 2010; Mahapatra y cols, 2011; figura 2). Durante la transición por los diferentes voltajes (\sim de -60 mV hasta $+30$ mV), se activan los diferentes subtipos de CCDV (L, N, P-Q, R; figura 2) en esta fase del potencial de acción se controla el influjo de Ca^{2+} , que determina el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en consecuencia, la secreción de catecolaminas (Artalejo, 1995).

La repolarización se da cuando gradualmente se activan los canales de K^+ dependientes de voltaje, mientras que la despolarización inactiva a los canales de Na^+ ; en este momento los canales de Ca^{2+} permanecen activados. En esta fase el Ca^{2+} que entra activa la corriente de K^+ tipo BK sensible a cambios en el potencial de membrana y a cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se considera que la corriente BK controla la duración del potencial de acción, así como el intervalo de tiempo entre los potenciales de acción. La última fase es la hiperpolarización y depende de la activación de las corrientes de K^+ sensibles a Ca^{2+} , BK y SK (Schlegel y Mollard, 1995; figura 2).

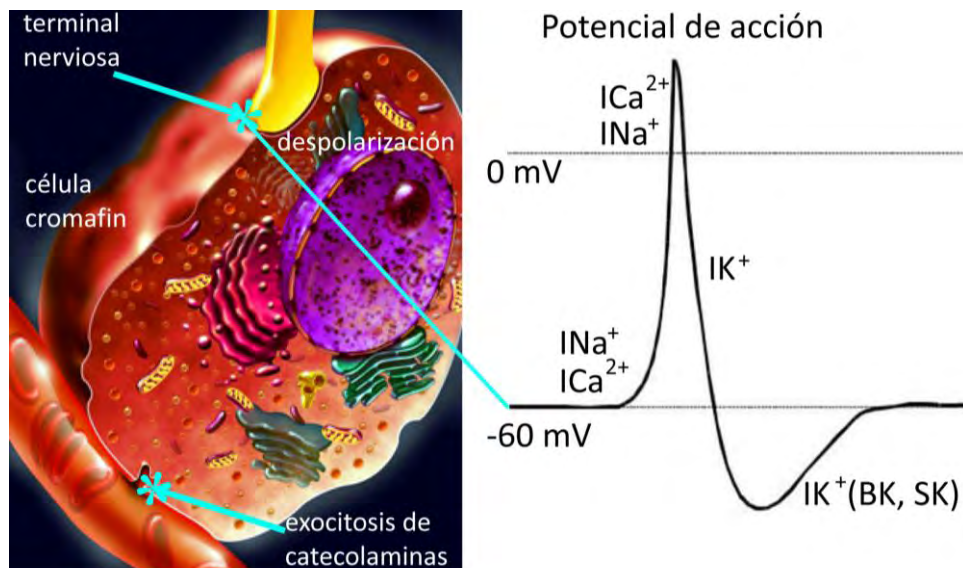


Figura 2. Estimulación de la célula cromafin. A la izquierda se esquematiza la terminal del nervio esplácnico que libera ACh promoviendo la despolarización de la célula cromafin, si el estímulo sobrepasa el umbral de disparo del potencial de acción se generan uno o más potenciales de acción. El Ca^{2+} que entra a la célula promueve la fusión de los gránulos con la membrana para liberar las catecolaminas contenidas hacia el torrente sanguíneo. A la derecha se esquematiza un potencial de acción y las diferentes corrientes que se activan durante la transición por los diferentes voltajes.

4.3 IMPORTANCIA DEL Ca^{2+} EN LA SECRECIÓN

El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es el factor que ocasiona la movilización de los gránulos hacia la membrana celular para liberar las sustancias almacenadas hacia el espacio extracelular por medio de exocitosis (Douglas 1968). Se considera que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre en el citoplasma es 0.1 mM, mientras que en el medio extracelular es de 2 mM, esto genera un alto gradiente electroquímico por lo que al abrirse los CCDV el Ca^{2+} tiende a entrar generando microdominios de Ca^{2+} . Los micro-dominios de Ca^{2+} son señales focalizadas transitorias o sostenidas altamente reguladas espacial y temporalmente para promover la exocitosis, dichas señales no solo dependen del Ca^{2+} que entró por los CCDV, también dependen de que el Ca^{2+} se incorpore al retículo endoplásmico o a la mitocondria, organelos que funcionan como reservorios intracelulares de Ca^{2+} (Alonso y cols, 1999; Villalobos y cols, 2002; Weiss, 2012)

5. CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

5.1 ESTRUCTURA DE LOS CCDV.

Los CCDV, son importantes en las células excitables, pues a través de ellos se produce el influjo de Ca^{2+} y el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para producir exocitosis. Son complejos proteicos formados por una subunidad principal α de 190 a 250 kDa, que pueden estar en asociación con subunidades accesorias β , $\alpha_2\delta$ y γ (figura 3). La subunidad principal esta compuesta por cuatro dominios mantenidos juntos por una cadena polipeptídica simple, cada dominio se conforma de 6 segmentos transmembranales mas una asa "P" que se sumerge parcialmente entre la membrana para formar el poro entre los segmentos S5 y S6. El S4 es el sensor de voltaje (Catterall, 2011; figura 3). Las asas citoplásmicas que unen a los cuatro dominios son los sitios de interacción con las subunidades β , con segundos mensajeros o con proteínas de unión de

membrana y pueden modificar el mecanismo de apertura-inactivación-cierre (gating) del canal (figura 3).

Actualmente se han clonado 10 subunidades α con funciones y distribuciones especializadas. La diversidad de los subtipos de CCDV se debe a la existencia de múltiples genes que codifican para subunidades α y β además de que puede haber diferentes variantes de cada gen producidos por splicing alternativo; la otra razón que explica la diversidad es por la combinación de las diferentes subunidades que dan origen al canal como un complejo proteico funcional (ver Tabla 1; Catterall, 2000; García y cols, 2006; Catterall, 2011).

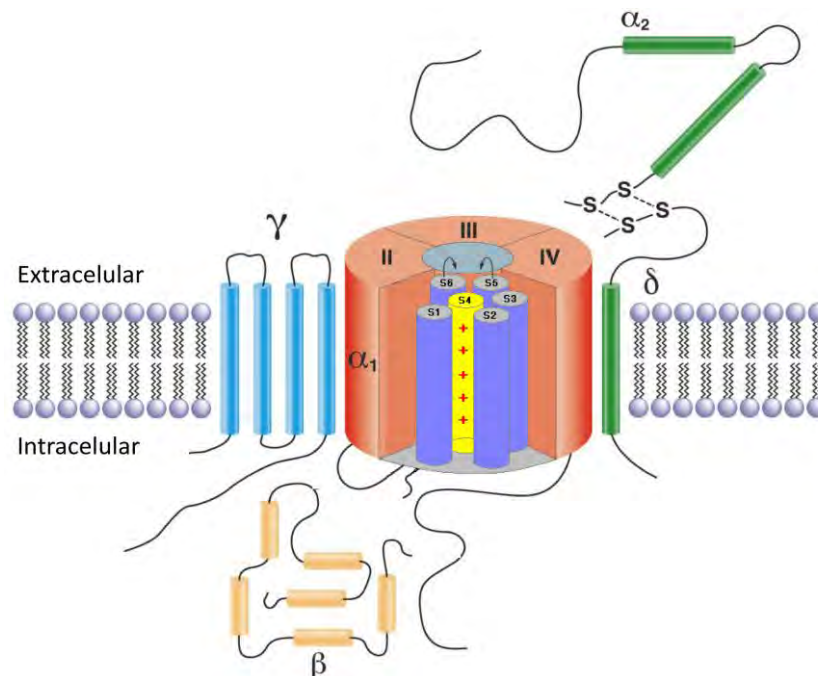


Figura 3. Representación esquemática de un CCDV. Se observa la subunidad principal α_1 compuesta por cuatro dominios, cada uno constituido por seis segmentos transmembranales (S1 – S6). El S4 funciona como sensor de cambios en el voltaje, mientras que el asa que une al S5 y S6 conforma el poro del canal. Además se representan las subunidades accesorias α_2 , δ , β y γ , que pueden modificar el gating del canal, además pueden o no estar presentes para formar un canal funcional. Tomado y modificado de Catterall, 2000.

5.2 NOMENCLATURA Y CLASIFICACIÓN DE LOS CCDV

Existe una clasificación que se basa en el voltaje de activación de los CCDV; de alto voltaje de activación (high voltaje-activated HVA) y los de bajo

voltaje de activación (low voltaje-activated LVA). Otra se basa en la subunidad α que forma al canal α_{1A} , α_{1B} , etc (ver Tabla 1); mientras que otra manera de nombrarlos es refiriéndose en primer término al ión permeable, seguido del estímulo principal para la apertura y cierre del canal y dos números separados por un punto, el primer número indica la familia de proteínas y el segundo a la isoforma α particular. Ejemplo, $Ca_v3.1$: canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo T codificado por la subunidad α_{1G} (Yamakage, 2002)

La familia HVA se subdivide en la familia Ca_v1 con 4 miembros (tipo L), y la familia Ca_v2 con tres miembros (tipo N, P-Q, R), mientras que de la familia LVA se consideran tres miembros que pertenecen a la familia Ca_v3 (tipo T; ver Tabla 1). La clasificación en cuanto al voltaje de activación se considera solo indicativa, pues por ejemplo los canales $Ca_v1.3$ tipo L se activan a valores más negativos, cercanos a los voltajes a los cuales se activan los canales Ca_v3 . (Lipscombe y cols, 2004; Singh y cols, 2008; Marcantoni y cols, 2010; Mahapatra y cols, 2011). La clasificación detallada de los CCDV se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Clasificación y nomenclatura de los CCDV. Tomado de García y cols, 2006.

Calcium Channel Type					
Novel nomenclature	Traditional nomenclature	Type of Current	Blockers	Activators	Tissue Location
Cav 1.1	α_{1S}	L	Nifedipine Nisoldipine Nitrendipine	BAY K 8644 FPL64176	Skeletal muscle
Cav 1.2	α_{1C}	L	Nifedipine Nisoldipine Nitrendipine	BAY K 8644 FPL64176 PCA50941	Heart Smooth muscle Brain Pituitary Adrenal medulla
Cav 1.3	α_{1D}	L	Nifedipine Calcicludine	BAY K 8644 FPL64176 PCA50941	Brain Pancreas Adrenal medulla Cochlea Kidney Ovary Retina
Cav 1.4	α_{1F}	L	Nifedipine	BAY K 8644 FPL64176	
Cav 2.1	α_{1A}	P/Q	ω -Aga-IVA ω -Ctx-MVIIC ω -Ctx-MVIID		Cerebellum Pituitary Cochlea Adrenal medulla
Cav 2.2	α_{1B}	N	ω -Ctx-GVIA ω -Ctx-MVIA		Brain Peripheral nervous system Adrenal medulla
Cav 2.3	α_{1E}	R	SNX-482		Brain Cochlea Retina Heart Pituitary Adrenal medulla
Cav 3.1	α_{1G}	T	Mibefradil		Brain Peripheral nervous system Adrenal medulla
Cav 3.2	α_{1H}	T			Heart Brain Kidney Liver Adrenal glomerulosa Adrenal medulla
Cav 3.3	α_{1I}	T			Brain

ω -Aga-IVA, ω -agatoxin IVA; ω -Ctx-GVIA, ω -conotoxin GVIA; ω -Ctx-MVIA, ω -conotoxin MVIA; ω -Ctx-MVIIC, ω -conotoxin MVIIC; ω -Ctx-MVIID, ω -conotoxin MVIID.

5.3 CCDV EN CÉLULAS CROMAFINES.

Las células cromafines de diferentes especies de mamíferos expresan diferentes subtipos de los CCDV mencionados anteriormente y participan importantemente en la excitabilidad (Gandía y cols, 1995; Carbone y cols, 2006; García y cols, 2006; Marcantoni y cols, 2008; Vandael y cols, 2010). Su densidad de expresión cambia notablemente entre especies, aunque se considera que su funcionalidad permanece muy parecida o idéntica (figura 4). La activación de los CCDV promueve la generación de potenciales de acción, controla la secreción de catecolaminas y el reciclado vesicular, también regula los eventos dependientes de Ca^{2+} que se originan cerca de la membrana celular (García y cols, 2006).

Los CCDV tipo L se expresan de forma mayoritaria en diferentes tejidos controlando diferentes respuestas dependientes de Ca^{2+} en células excitables. Se conocen 4 miembros $Ca_v1.1$, 1.2, 1.3 y 1.4; en las células cromafines solo

se expresan las isoformas $Ca_v1.2$ y 1.3 (García-Palomero y cols, 2000; Baldelli y cols, 2004; Benavides y cols, 2004; Marcantoni y cols, 2010), los cuales son altamente sensibles a los bloqueadores 1,4-dihidropiridinas (nifedipina, nimodipina, nitrendipina) o activadores (Bay-K 8644). Estos canales presentan inactivación producida por Ca^{2+} . $Ca_v1.2$ y 1.3 son altamente expresados en células cromafines de rata y ratón, aproximadamente 50% (figura 4; Gandía y cols, 1995; Hernández-Guijo y cols, 1998; García y cols, 2006; Hernández y cols, 2011) y el Ca^{2+} que entra a través de ellos controla una gran proporción de liberación de catecolaminas inducida por diferentes señales, como puede ser la estimulación sostenida del nervio esplácnico (López y cols, 1992) por despolarización inducida por alto K^+ o por ACh (Ceña y cols, 1983), o por pulsos de fijación de voltaje (Horrigan y Bookman, 1994; Carabelli y cols, 2003; García y cols, 2006; Marcantoni y cols, 2008); esto debido a que se inactivan lentamente y permiten un influjo mayor de Ca^{2+} . Además, se ha reportado que $Ca_v1.3$ puede controlar corrientes subumbrales que regulan el disparo de potenciales de acción (Marcantoni y cols, 2010; Mahapatra y cols, 2011).

Los CCDV tipo P-Q, N, y R también se expresan en las células cromafines por las subunidades $Ca_v2.1$, 2.2 y 2.3 respectivamente y en diferentes densidades; en rata y ratón representan entre 15-20 % P-Q, 30 % N y 10-20 % R (figura 4; García y cols, 2006) y se ha reportado que su función está finamente acoplada a la secreción (Kim y cols, 1995; Horrigan y Bookman 1994; Chan y cols, 2005). Se ha considerado que tienen una participación importante durante la fase de despolarización y la repolarización del potencial de acción. Farmacológicamente los CCDV de tipo P-Q son bloqueados por ω -agatoxina IVA (Mintz y cols, 1992; Mintz y cols, 1993). Los CCDV tipo N son bloqueados irreversiblemente por ω -conotoxina GVIA, pero también pueden bloquearse por ω -conotoxina MVIIA, MVIIC y MVIID. Los de tipo R son sensibles a Ni^{2+} y a Cd^{2+} . Cabe mencionar que la proporción de los CCDV tipo R en las células cromafines puede variar dependiendo de la configuración de fijación de voltaje que se utilice, con parche perforado se detectan mejor que cuando se utiliza configuración de célula completa (Albillos y cols, 2000).

Por otra parte, los CCDV tipo T se caracterizan por activarse transitoriamente por despolarizaciones cercanas al potencial de reposo, su

inactivación es dependiente de voltaje e independiente del Ca^{2+} y se completa en decenas de milisegundos a potenciales positivos. Farmacológicamente se distinguen por ser bloqueados por los iones inorgánicos Ni^{2+} y Cd^{2+} (Matteson y Armstrong, 1986; Fox y cols, 1987) también son bloqueados por amilorida, mibefradil y un análogo de mibefradil NNC 55-0396 (Catterral, 2000; Huang y cols, 2004). Los reportes indican que los CCDV tipo T se expresan principalmente en células cromafines de animales en etapas inmaduras (fetales y neonatos) en proporción aproximada de 50% (Bournaud y cols, 2001; Levitsky y López-Barneo, 2009), mientras que su expresión en células cromafines de animales maduros es casi nula (Gandía y cols, 1995; Hollins e Ikeda, 1996; Bournaud y cols, 2001; Levitsky y López-Barneo, 2009). Experimentalmente, se han podido re-exresar en células cromafines de animales adultos incubadas con AMPc, por medio de sobre-estimulación β adrenérgica (Novara y cols, 2004) y por denervación de la médula suprarrenal (Levitsky y López-Barneo, 2009).

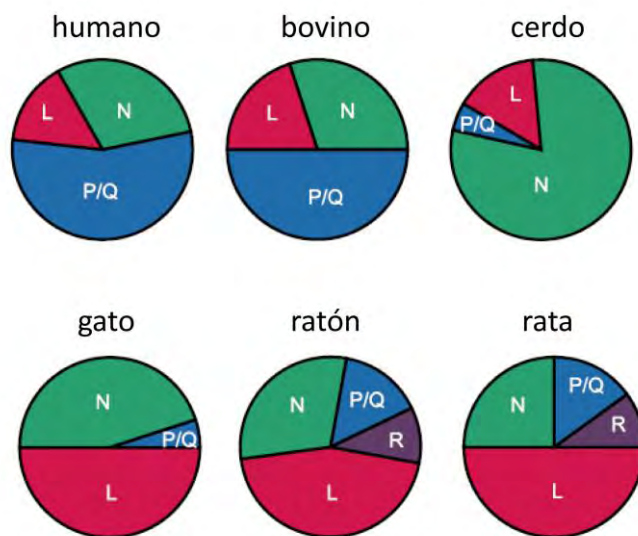


Figura 4. CCDV en células cromafines. Proporción de los distintos subtipos de CCDV en células cromafines de diferentes especies en etapa adulta. Tomado y modificado de García y cols, 2006.

La importancia de las células cromafines radica en la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo. Dicha liberación depende, en gran parte, de la entrada de Ca^{2+} al interior celular a través de los CCDV. Se ha propuesto que alteraciones en el sistema simpatoadrenal, específicamente un incremento

de catecolaminas circulantes, interviene en la patogénesis de la hipertensión esencial, pero ello no es del todo claro. Existe un modelo animal de hipertensión esencial ampliamente utilizado para determinar las posibles anomalías fisiológicas que preceden la hipertensión esencial, dicho modelo son las ratas espontáneamente hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés spontaneously hypertensive rats)

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

6.1 MODELO ANIMAL DE HIPERTENSION ESENCIAL

La cepa de ratas SHR fueron descubiertas y establecidas en 1966 por el profesor Kozo Okamoto y sus colegas en Kyoto. Esta cepa se ha consolidado un como el modelo animal para estudiar la patogénesis de la hipertensión esencial humana (de causas desconocidas). El modelo SHR no es el único utilizado para el estudio de la hipertensión, pero se considera de los más útiles por las similitudes que comparte con la hipertensión esencial humana (Louis y Howes, 1990).

Aoki y Okamoto en Kyoto evaluaron los valores de presión arterial en un grupo de ratas Wistar las cuales mostraron valores promedio de 120-140 mm Hg de presión sistólica; a este grupo normotenso se le denominó Wistar Kyoto (WKY). Sin embargo, uno de los machos examinados presentó valores elevados de presión sistólica entre 145-175 mm Hg; en el seguimiento de la presión arterial a través del tiempo esta rata mantuvo sus valores elevados. Dicho espécimen se cruzó con una hembra que presentó valores de 130-140 mm Hg de presión sistólica y a partir de la generación obtenida de dicho cruzamiento y de la endogamia entre las siguientes generaciones se obtuvo una colonia de ratas que mantuvo valores uniformemente altos de presión <180 mm Hg (sistólica) a las 20 semanas de edad; a esta cepa se le denominó SHR (Committe of Care and Use of Spontaneously Hypertensive Rats (CCUSHR), 1976).

6.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS RATAS SHR.

Se considera que el 100% de las ratas SHR desarrollan presión arterial por arriba de 150 mm Hg en la semana 15 de edad (CCUSHR, 1976). De la misma manera que en humanos hipertensos las ratas SHR presentan trastornos asociados a la hipertensión como lesiones cerebrales (infarto, hemorragia) lesiones al miocardio (infarto, fibrosis) y nefrosclerosis (benigna y maligna); los reportes indican que estas lesiones se observan a partir de los 3 meses de edad. La vida media de estas ratas se considera para el macho SHR de 18 meses y de WKY es de al menos 24 meses, por lo que se considera que la hipertensión reduce un 25 % la vida media de las ratas SHR en comparación con las ratas WKY (CCUSHR, 1976).

Entre las características que permitieron establecer a las ratas SHR como modelo de hipertensión esencial humana se encuentran las siguientes similitudes: existe un componente genético de al menos una tercera parte que predispone a la hipertensión, se considera que en ambos casos la patogénesis deriva poli-genéticamente, no existe un mecanismo específico que explique dicha patología. El curso temporal de la enfermedad es similar, la presión tiende a elevarse con la edad, presentando incrementos de presión durante la juventud y se mantiene elevada en la etapa adulta. En ambos casos se presenta hipertrofia y dilatación del ventrículo izquierdo que puede generar insuficiencia cardíaca, derrame hemorrágico, nefrosclerosis que produce daño en la función renal y una fase maligna de hipertensión con necrosis fibrinoide de arteriolas y pequeñas arterias (CCUSHR, 1976; Cowley, 2006; Dornas y Silva, 2011).

Se ha considerado que durante las primeras etapas con presión elevada en ratas SHR y en humanos el gasto cardíaco es normal, lo que se ha reportado que incrementa es la resistencia vascular periférica por lo que el corazón tiene que incrementar la presión con la que bombea la sangre a todo el cuerpo. Por otra parte, se ha considerado al consumo de sal como factor importante en el desarrollo de la hipertensión esencial humana y en ratas SHR, pues dietas bajas en sal permiten alcanzar valores de hipertensión moderada y dietas altas en sal aceleran la hipertensión y esta puede ser severa. Los tratamientos antihipertensivos previenen o reducen la incidencia de las

complicaciones mencionadas anteriormente en pacientes con hipertensión esencial y en ratas SHR. Cabe mencionar que las ratas SHR se usan también para la experimentación de drogas antihipertensivas (CCUSHR, 1976; Dornas y Silva, 2011). Otra aplicación para la que se utilizan las ratas SHR es como modelo de déficit de atención, pues presentan tres características principales del desorden: impulsividad, desatención e hiperactividad (Hill y cols, 2012).

6.3 RATAS WKY COMO CONTROL NORMOTENSO

El Comité para el Cuidado y Uso de Ratas Espontáneamente Hipertensas (1976) ha establecido que para propósitos comparativos, por derivación solo la cepa WKY debe utilizarse como el control adecuado de las ratas SHR. En referencia al control normotenso recomendado (cepa WKY) también se ha reportado como un modelo animal para el estudio de la ansiedad, pues al igual que en ratas SHR, presentan impulsividad e hiperactividad (Will, 2003; Hendley, 2000). Se ha reportado que el comportamiento de las ratas WKY no es normal cuando se compara con otras cepas de ratas normotensas. La cepa WKY se caracteriza por presentar anomalías hormonales, de comportamiento y mediciones fisiológicas que emula un cuadro depresivo o de ansiedad, también se caracterizan por presentar hiperactividad al estrés y presentan desregulación del eje hipotálamo – hipófisis – adrenal, comparado con la cepa Wistar (Will, 2003). Para que los resultados de este trabajo fueran más confiables, utilizamos ratas hipertensas SHR y normotensas WKY para caracterizar electrofisiológicamente la ICa en las células cromafines.

II. ANTECEDENTES.

La estimulación simpática de los vasos sanguíneos y del corazón incrementa la presión sanguínea; la resistencia vascular periférica incrementa por la estimulación directa de la vasoconstricción arterial y también por activación del sistema renina-angiotensina con el consecuente incremento de producción de angiotensina II. Estos cambios promueven que el gasto cardiaco

aumente por el incremento de contractilidad del miocardio y por incremento en el retorno venoso. Si estos cambios se mantienen a través de un periodo de tiempo prolongado puede originarse hipertensión arterial (Cowley, 2006; Guyton y Hall, 2011).

Se ha sugerido que alteraciones a nivel del SNS y en el sistema renina-angiotensina, ambos considerados sistemas vaso-activos intervienen importantemente en la patogénesis de la hipertensión esencial (Antonaccio y Kerwin, 1981; Laflamme y cols, 1997; Grassi y cols, 1998), pero hasta la fecha, la participación del sistema simpatoadrenal en la patogénesis de la hipertensión esencial es compleja y controversial. No obstante, se sugiere que dicho sistema es un componente clave para la génesis y/o mantenimiento de la hipertensión esencial (Goldstein, 1983; Westfall y Westfall, 2007; Pinterova y cols, 2011).

Las evidencias en pacientes jóvenes que presentan hipertensión esencial manifiestan, entre otros síntomas, ritmo cardiaco incrementado y niveles de catecolaminas en plasma elevados (NA y dopamina) 0.370 ng/ml en hipertensos vs 0.218 ng/ml en normotensos detectados radiométricamente. (deChamplain, 1976). En diversos reportes se sugiere que el incremento de catecolaminas circulantes se debe a hiperactividad del SNS (Goldstein, 1983; Landsberg y Young, 1992; Dornas y Silva, 2011). Por otra parte, en otros estudios se ha evaluado por medio de micro-neurografía y por medio del análisis del ritmo cardiaco, que en pacientes con hipertensión esencial el grado de hiperactividad del SNS está directamente relacionado con el grado de hipertensión (Grassi y cols, 1998). Aunque se desconoce si la hiperactividad sostenida del sistema simpatoadrenal pueda ser la causa próxima de la elevación de la presión sanguínea en la hipertensión esencial, los reportes sugieren que dicha hiperactividad antecede la elevación de la presión sanguínea (Landsberg y Young, 1992).

De manera interesante y en concordancia con alteraciones del sistema simpatoadrenal en la hipertensión, se ha reportado que la mayoría de personas con feocromocitoma, tumor de células cromafines que produce una elevada liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo, manifiestan el incremento de catecolaminas como un aumento de la presión sanguínea (Landsberg y Young, 1992; Zuber y cols, 2011).

A continuación se enuncian algunas observaciones en pacientes con hipertensión esencial que sugieren que el sistema simpatoadrenal es importante en el mantenimiento de la hipertensión: a) Los niveles de noradrenalina en plasma y urinarios se han reportado elevados; sin embargo, la eliminación de noradrenalina en plasma no se altera en algunos pacientes con hipertensión esencial (Goldstein, 1983; Pinterova y cols, 2011). b) Pacientes con hipertensión muestran mayor sensibilidad a los efectos presores de noradrenalina (Pinterova y cols, 2011). c) En modelos experimentales de hipertensión esencial se requiere que el sistema simpatoadrenal se mantenga intacto para el inicio y mantenimiento del estado hipertenso (Borkowski y Quinn, 1983, Lee y cols, 1991), además se ha reportado actividad incrementada del SNS. d) La aplicación de agentes simpatolíticos disminuyen los valores de presión sanguínea, tanto en pacientes como en animales hipertenso (Landsberg y Young, 1992).

Como ya se ha mencionado, la patogénesis de la hipertensión esencial en humanos no se conoce, pero existe un modelo de hipertensión esencial animal que es ampliamente utilizado para el estudio de las posibles alteraciones que pueden originar la hipertensión, las ratas SHR, en las cuales se ha reportado que el incremento en la resistencia vascular periférica antecede a la hipertensión (Dornas y Silva, 2011; Pinterova y cols, 2011). Los reportes indican que parte de los efectos de las catecolaminas circulantes es incrementar la resistencia vascular periférica; por lo que no se descarta la posible participación del incremento de las catecolaminas circulantes en el origen y/o mantenimiento de la hipertensión en este modelo animal (Goldstein, 1983; Pinterova y cols, 2011). Además, de modo similar a como ocurre en pacientes hipertenso, en el modelo de la rata SHR se ha observado hiperactividad de SNS y niveles de catecolaminas circulantes incrementados (Grobeck y cols, 1975; Pak, 1981; Goldstein, 1983; Grassi y cols, 1998).

Se ha descrito que el 100% de las ratas SHR a las 15 semanas de edad mantienen los valores de presión arterial por arriba de los 150 mm Hg, pero de manera interesante está reportado que tienen actividad simpática incrementada en etapas juveniles. Por tal motivo, diferentes estudios se enfocan en etapas juveniles (antes de 15 semanas de edad) para tratar de elucidar las anomalías que preceden el origen de la hipertensión esencial (Head, 1989).

Cassis y colaboradores en 1985 por medio del análisis de un estudio con histofluorescencia y microscopía electrónica demostraron que existe mayor innervación simpática en los vasos sanguíneos de ratas SHR comparado a las ratas normotensas WKY, sugiriendo que la mayor innervación era un factor que podría promover el incremento de la resistencia vascular periférica.

En un estudio elaborado por Lee y colaboradores en 1987 se demostró que la eliminación de la innervación simpática (simpatectomía) de las arterias periféricas en etapa neonatal con un tratamiento que consiste en la aplicación de anti-NGF (Factor de crecimiento neuronal) y guanetidina durante las primeras cuatro semanas de edad, es posible prevenir o atenuar el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR. Los valores de presión sistólica en SHR control fueron < 150 mm Hg y en simpatectomizadas se redujo a 139 ± 2 mm Hg, dicho tratamiento no afectó los valores de presión sistólica en ratas WKY control y tratadas (115 ± 4 mm Hg y 112 ± 5 mm Hg respectivamente; figura 5) Sin embargo, es notorio que el valor promedio de presión sistólica en ratas SHR simpatectomizadas se mantuvo mayor que en las ratas WKY e incluso llegaron a presentar hipertrofia cardíaca. Esta observación sugiere que en las ratas que han perdido la innervación simpática en las arterias periféricas, existe otro mecanismo que ayuda a mantener elevados los valores de presión arterial.

Por otra parte, el grupo de Tung en 1981 evaluó el efecto del incremento de adrenalina en sangre mediante la implantación en ratas de un depósito de liberación lenta de adrenalina. Los resultados demostraron un incremento en los valores de presión arterial, apoyando la hipótesis de que niveles elevados de adrenalina circulante podrían tener una participación en el origen de la hipertensión. Estos datos permitieron focalizar la atención en la liberación de adrenalina por parte de la médula suprarrenal y su posible participación en el origen de la hipertensión esencial.

Un trabajo crucial donde se evaluó si la médula suprarrenal participa en el origen de la hipertensión fue realizado por Borkowski y Quinn en 1983. Ellos determinaron el efecto de eliminar la médula suprarrenal (desmedulación) en ratas jóvenes (4 semanas de edad) y adultas, ellos demostraron que cuando la desmedulación se realizaba en etapas juveniles los valores de presión arterial en ratas SHR fueron menores comparados al grupo que no recibió el tratamiento (170 mm Hg vs 210 mm Hg, respectivamente). Resultados

similares se obtuvieron por Lee y cols en 1991 (figura 5). Estos resultados no se hicieron evidentes cuando la desmedulación se realizó en etapas adultas. La información que arrojaron los reportes anteriores sugiere que es durante etapas juveniles cuando la hiperactividad del SNS y los efectos de las catecolaminas provenientes de la médula suprarrenal tienen una participación sinérgica, lo que puede traducirse en etapas adultas como hipertensión, al menos en el modelo de las ratas SHR.

Para 1991, Lee y colaboradores comprobaron el efecto que tiene sobre la presión arterial la combinación de la simpatectomía y la desmedulación suprarrenal en ratas SHR durante las primeras 4 semanas de edad (figura 5). Los resultados de ese interesante trabajo no solo demostraron que la hipertensión se previene sino que los valores de presión arterial se mantienen similares entre ratas SHR y el grupo control WKY (120 ± 6 mm Hg vs 108 ± 1 mm Hg); asimismo se previno la hipertrofia cardíaca observada en las ratas SHR no tratadas. Esta evidencia confirma que el SNS y la médula suprarrenal intervienen sinérgicamente en la patogénesis de la hipertensión esencial.

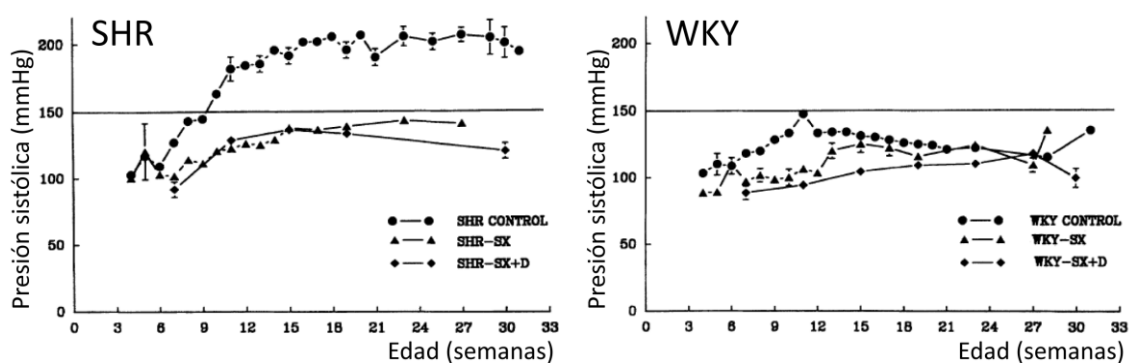


Figura 5. Simpatectomía y desmedulación en ratas SHR y WKY. Efecto de simpatectomía o simpatectomía + desmedulación en etapa juvenil sobre la presión arterial de ratas SHR y WKY. Tomado y modificado de Lee y cols, 1991.

La interrogante que surge es ¿la médula suprarrenal de ratas SHR libera una cantidad mayor de catecolaminas que la médula suprarrenal de ratas WKY y esto contribuye al origen de la hipertensión esencial? Está establecido que entre un 80 – 90 % de las catecolaminas secretadas por la médula suprarrenal corresponde a adrenalina; por lo tanto el grupo de Lim, Jang y Park en 2002

realizó la cuantificación de la liberación de catecolaminas de glándulas adrenales aisladas de ratas SHR y el control WKY mediante el análisis de la perfusión colectada por medio de la técnica fluorométrica de Anton y Sayre propuesta en 1962 (Lim y cols, 2002).

De manera interesante, los resultados muestran que la secreción de catecolaminas de manera basal (sin estimulación) es parecida entre las cepas WKY y SHR; sin embargo al estimular con ACh, se observó que la secreción es mayor de glándulas de ratas SHR comparado con ratas WKY (522 ± 33 vs 320 ± 21 ng en 4 minutos, respectivamente). Por otra parte, cuando las glándulas fueron perfundidas con una solución con alta concentración de K^+ , que despolariza instantáneamente a las células induciendo la liberación de catecolaminas, también fue mayor la cantidad de catecolaminas secretadas de glándulas de ratas SHR comparado con ratas WKY (278 ± 22 vs 198 ± 16 ng en 4 minutos). Como anteriormente se explicó, estas dos formas de estimulación activan a los diferentes CCDV que controlan el influjo de Ca^{2+} para promover la exocitosis. Del mismo modo, al perfundir las glándulas con un activador de canales de calcio tipo L, Bay K-8644, que permite el incremento de la entrada de Ca^{2+} a las células promoviendo la liberación de catecolaminas, se obtuvo que también fue mayor la secreción de catecolaminas de glándulas de ratas SHR que en WKY (168 ± 14 vs 88 ± 8 ng en 4 minutos). En resumen, estos datos demuestran que la secreción de catecolaminas al estimular a las células cromafines de la médula suprarrenal es mayor en las ratas SHR que en las ratas WKY. Por otra parte, en 2008, Miranda-Ferreira demostró que las células cromafines de ratas SHR liberan catecolaminas más rápido, en mayor cantidad y por un período de tiempo más prolongado en comparación con células cromafines de ratas normotensas Sprague-Dawley, ya sea por medio de estimulación con ACh o con alta concentración de K^+ (figura 6).

Esta información sugiere una alteración en alguno de los diferentes componentes que participan en la secreción de catecolaminas después de la estimulación, pues con la técnica de amperometría que se realizó en células aisladas y dissociadas y que carecen de la inervación esplácnica, existen diferencias en la secreción (Miranda-Ferreira y cols. 2008; 2009). Las causas de dicha alteración no se conocen y pueden estar a nivel de canales iónicos, a nivel del control del $[Ca^{2+}]_i$, a nivel de un contenido mayor de catecolaminas por

gránulo o incluso a nivel de la maquinaria exocitótica que se activa para fusionar el gránulo con la membrana celular.

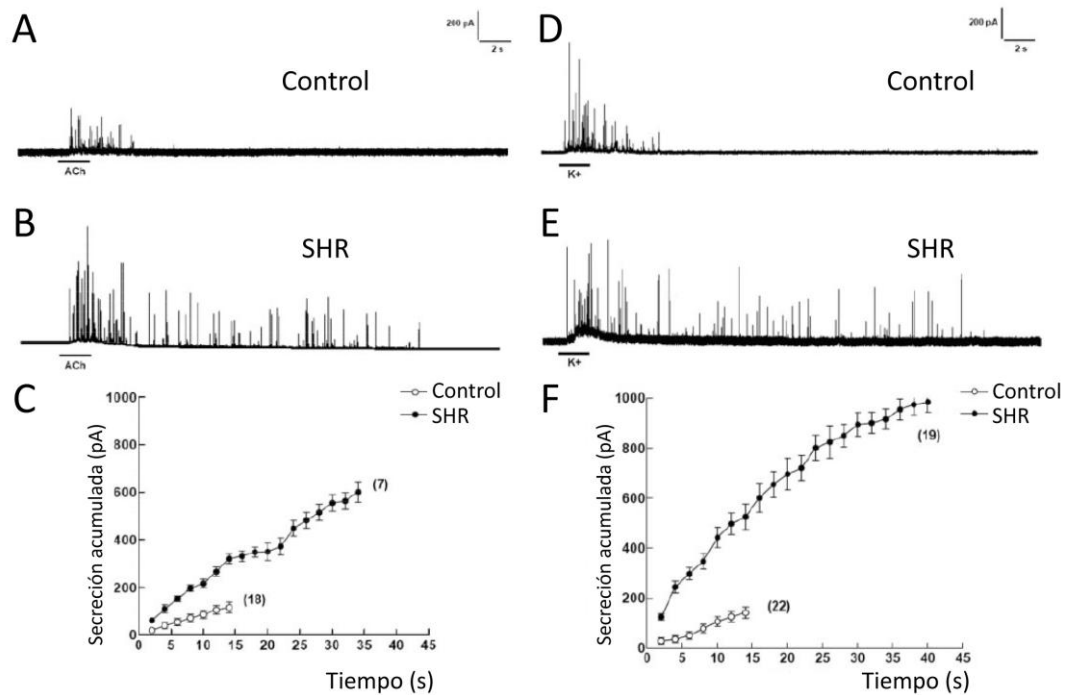


Figura 6. Hipersecreción de catecolaminas de células cromafines de ratas SHR. Registros amperométricos de secreción de catecolaminas de células cromafines de ratas normotensas (A,D) e hipertensas SHR (B,E), mediante estimulación por ACh o alta concentración de K⁺. Cada espiga que se observa en el registro equivale a la oxidación de las catecolaminas liberadas por la fusión de un gránulo con la membrana. La cuantificación de la secreción acumulada en el tiempo después de la estimulación por ACh (C) o alto K⁺ (F) se obtuvo al sumar el área bajo la curva debajo las espigas. Tomado y modificado de Miranda-Ferreira y cols, 2008.

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.

Se ha sugerido que el incremento de catecolaminas en sangre está relacionado con el inicio y/o mantenimiento de la hipertensión esencial. Debido a que se desconoce en qué nivel del acople estímulo-secreción puede estar la diferencia en la secreción de catecolaminas de ratas hipertensas SHR comparado con ratas normotensas; en este trabajo nos enfocamos en los CCDV de las células cromafines; pues como se describió, la estimulación de las células cromafines produce la despolarización de la membrana celular, induciendo potenciales de acción lo que promueve la activación de los CCDV generando el incremento del calcio intracelular. Esto se traduce en la activación de la maquinaria celular de secreción para que se lleve a cabo la fusión de los gránulos de secreción con la membrana celular y se de la liberación de catecolaminas.

La expresión y regulación de los CCDV de las células cromafines se altera por la disociación enzimática y por el tiempo que permanecen en cultivo (Yaari y cols, 1987; Benavides y cols, 2004). Para evitar esta situación, decidimos evaluar la ICa en rebanadas frescas de tejido adrenal, preparación en la cual las células mantienen sus interacciones normales y el ambiente tisular es prácticamente igual al de la situación *in vivo*.

Este trabajo está enfocado en caracterizar electrofisiológicamente y farmacológicamente la ICa en células cromafines de la médula suprarrenal, comparando las propiedades de la ICa en rebanadas de tejido adrenal de ratas SHR y de su control normotenso, WKY. Consideramos que los resultados obtenidos de esta investigación serán relevantes, debido a contribuyen a dilucidar la posible participación de los CCDV en la hipersecreción de catecolaminas de células cromafines reportada en la patogénesis de la hipertensión esencial.

IV. HIPÓTESIS

La mayor parte de la adrenalina circulante proviene de las células cromafines adrenales. Se sabe que en las ratas hipertensas SHR las células cromafines secretan más catecolaminas que las de las ratas normotensas

WKY. Debido a la enorme importancia que tiene la entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV durante el proceso de secreción, postulamos que la mayor liberación de catecolaminas en las células cromafines de las ratas SHR podría deberse a que éstas presenten una mayor entrada de Ca^{2+} a través de los CCDV comparado las células de ratas control WKY.

V. OBJETIVOS.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las propiedades electrofisiológicas de la ICa en células cromafines adrenales en rebanadas de glándula suprarrenal de ratas hipertensas (SHR) y normotensas (WKY).

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si en las células cromafines de ratas SHR hay una mayor densidad de canales de Calcio en comparación con las de las ratas WKY.
- Comparar la cinética de activación e inactivación dependiente de voltaje de la corriente de Calcio en células cromafines de ratas SHR y WKY.
- Determinar la proporción de los diferentes subtipos de canales de Calcio en células cromafines de ratas SHR y WKY.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. RATAS SHR Y WKY.

Los animales utilizados en el presente trabajo fueron obtenidos de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las colonias de ratas SHR y WKY se establecieron gracias a la Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo, Jefa de la Unidad Académica Bioterio en el año 2009, a partir de un grupo reproductor de cada cepa adquiridos de Charles River Laboratories (Wilmington, DE). Una vez establecidas las colonias, los animales fueron mantenidos en condiciones estándar a 22 °C con periodos de luz-oscuridad de 12x12 horas, y recibieron alimento y agua *ad libitum*. En algunos experimentos se utilizaron machos de la cepa de ratas Wistar (200-250 gr.) para fines comparativos.

1.1 MONITOREO DE LA PRESIÓN ARTERIAL.

La evaluación de la presión arterial en ratas utilizadas en los experimentos se realizó mediante una técnica indirecta no invasiva en las arterias caudales, a través de un pletismógrafo diseñado para el monitoreo de presión arterial en cola de roedores (LE 5002, Panlab Harvard Apparatus; figura 7). La maniobra por la cual se evalúa la presión arterial se realizó en un laboratorio mantenido a temperatura de 22 °C en condiciones de silencio para evitar estrés en la rata.

Para conseguir la correcta medición de la presión es indispensable que haya vasodilatación, la cual se logra al mantener la rata de 20 a 30 minutos a 30 °C, la vasodilatación permite que al colocar el sensor del pletismógrafo en la cola de la rata sea detectable el pulso y consecuentemente el valor de presión; para tales fines, se colocó un colchón térmico a 30 °C por un periodo de 30 minutos debajo de la jaula donde se mantiene a la rata, esto evita mantenerla inmovilizada durante este periodo de tiempo, impidiendo que la rata se estrese y los valores de presión arterial se alteren.

Pasado este periodo de tiempo, la rata fue pesada y colocada en un cepo para mantenerla inmobilizada dentro de una cámara térmica (dispositivo incorporado con el pletismógrafo) mantenida a 30 °C, dejando la cola libre (figura 7). Enseguida fue colocado el manguito sensor en la cola y se ubicó la zona donde hay una mejor señal de pulso, la calidad de la señal es indicada en el display del pletismógrafo (figura 7). Una vez localizada la señal, si esta se mantuvo constante; además de observar que la rata se encuentra tranquila y basándonos en que la señal del pulso sanguíneo muestra poca variación (± 10 pulsos por minuto mostrados en el display) se activó el dispositivo y se obtuvieron los valores de presión sistólica, presión diastólica, un valor medio de presión así como el valor de los latidos por minuto.

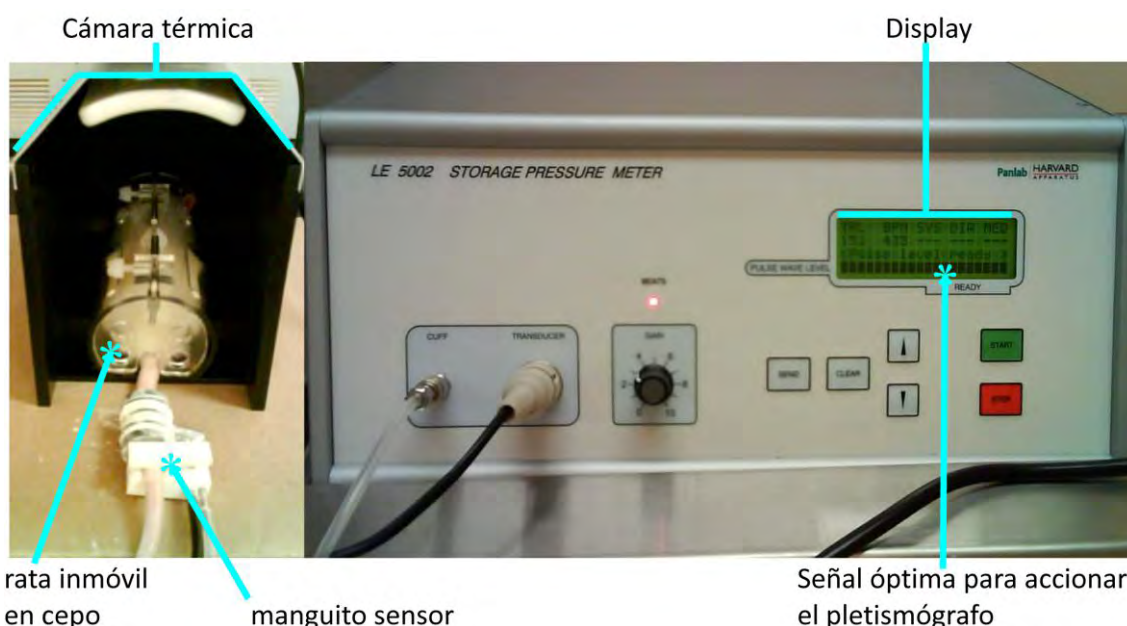


Figura 7. Evaluación de la presión arterial. A la izquierda se observa una rata inmobilizada en un cepo colocado al interior de la cámara térmica; en la parte media de la cola se colocó el manguito sensor que está conectado al pletismógrafo. A la derecha se observa el pletismógrafo, en el display se muestra el valor de la señal para realizar la medición y se registran los valores de presión arterial.

A cada rata utilizada se le evaluó la presión arterial 3 veces en el mismo día durante los 3 días previos al experimento: los valores obtenidos se promediaron y se muestran en la sección de resultados (tabla 2). Solo se consideraron como hipertensas a las ratas que presentaron valores de presión

sistólica \geq a 140 mm Hg. Las mediciones se realizaron en el periodo de tiempo que comprende entre las 10 de la mañana y las 2 de la tarde.

2. OBTENCIÓN DE LAS REBANADAS DE GLÁNDULAS SUPRARRENALES.

Para la obtención de las glándulas suprarrenales, las ratas se anestesiaron mediante la aplicación intraperitoneal de ketamina (75 mg/Kg)/xilacina (5 mg/Kg) y fueron sacrificadas por decapitación. Inmediatamente se extrajeron las glándulas suprarrenales y se colocaron en una solución salina con buffer de bicarbonatos (BBS) que contenía la siguiente composición en mM: 140 de NaCl, 2 de KCl, 0.1 de CaCl₂, 5 de MgCl₂, 26 de NaHCO₃ y 10 de Glucosa, gasificada continuamente con una mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5% para mantener viable el tejido. Las glándulas se limpiaron del exceso de tejido graso bajo un microscopio estereoscópico y posteriormente fueron incluidas en una mezcla a temperatura de 32-35 °C compuesta por 3% de agarosa diluida en la solución BBS anteriormente mencionada.

El gel que contenía a las glándulas se puso en refrigeración (3 minutos) para lograr la rápida solidificación, e inmediatamente se cortó en bloques cuadrados de aproximadamente 5 mm por lado, los cuales fueron pegados con cianocrilato en la placa de un microvibratomo (Leica VT-1000S). Las glándulas se seccionaron en rebanadas de 200 μ m de grosor (figura 8). Las rebanadas obtenidas fueron resuspendidas en solución BBS a temperatura ambiente con gasificación constante de O₂ 95 % y CO₂ 5 % hasta su registro. Los experimentos electrofisiológicos se realizaron desde las 2 hasta las 8 horas después de la obtención de las rebanadas.

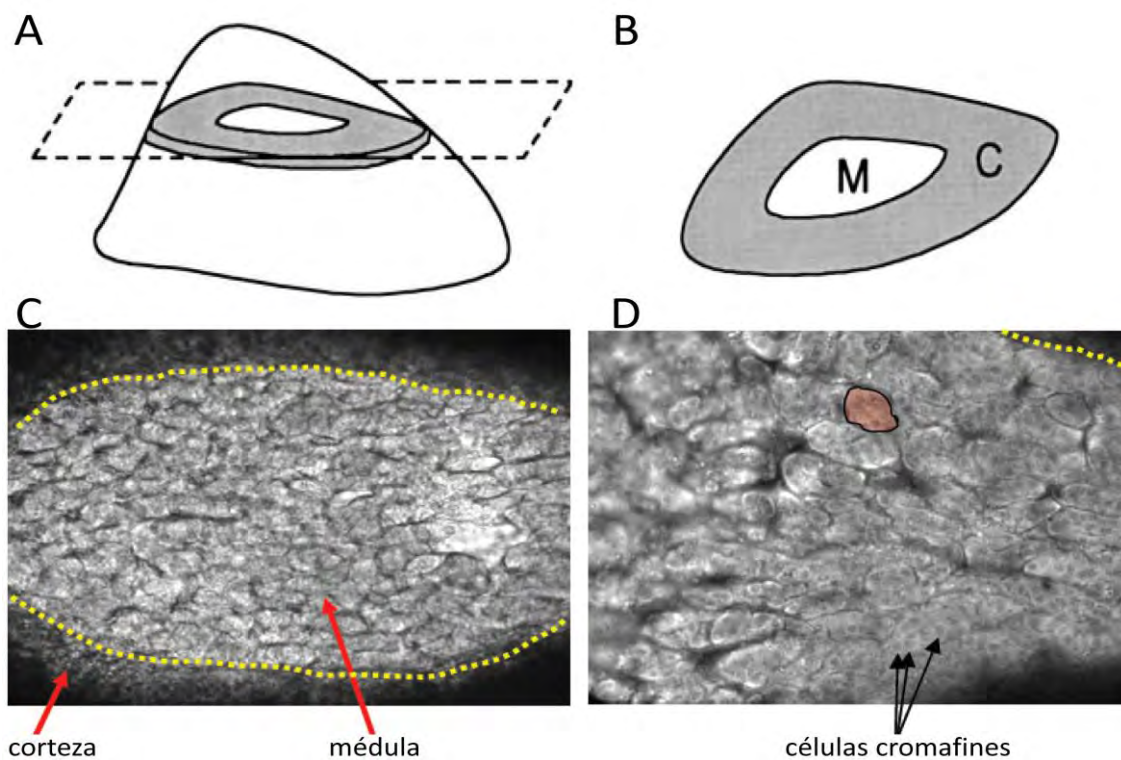


Figura 8. Obtención de rebanadas de glándula suprarrenal. **A)** Esquema que representa el seccionamiento de una glándula suprarrenal de rata. **B)** Representación de las rebanadas obtenidas donde se puede distinguir la corteza y la médula. **C)** Fotografía en contraste de fases de una rebanada de glándula suprarrenal de rata, la línea punteada delimita la médula de la corteza. **D)** Magnificación de una sección de la médula donde se distinguen puntos grises que son los núcleos de las células cromafines, en rojo se muestra un módulo que contiene varias células cromafines, cada módulo se considera como la unidad funcional de la médula suprarrenal.

3. REGISTROS ELECTROFISIOLÓGICOS.

3.1 TÉCNICA DE PATCH-CLAMP: FIJACIÓN DE VOLTAJE

Los registros de la corriente de calcio (ICa) se realizaron en fijación de voltaje mediante la técnica de patch-clamp en modalidad de célula entera (Hamill y cols, 1981) en una unidad diseñada para el registro electrofisiológico mantenida a 22 °C. En el caso de la aplicación gradual de bloqueadores específicos de los subtipos de CCDV, se utilizó la modalidad de parche perforado (Rae, 1991) que no implica la diálisis del medio intracelular y permite detectar el componente de CCDV tipo R (Albillos y cols, 2000). Para la

adquisición de los datos se utilizó un amplificador EPC-10 con el programa PatchMaster (HEKA instruments). Los datos de corriente se almacenaron en una computadora Machintosh G4 se adquirieron a frecuencia de 10 kHz y fueron filtrados a 2 kHz.

Para la fabricación de los microelectrodos de registro se utilizaron capilares de borosilicato con diámetro externo 1.2 mm y diámetro interno de 0.68 mm (World Precision Instruments, Florida, EUA), los cuales se colocaron en un estirador de capilares a base de calor modelo P-97 (Sutter Instruments Co., EUA). Cuando los microelectrodos de registro fueron llenados con solución intracelular y conectados al cabezal del amplificador, presentaron resistencias entre 2 a 5 megaohms ($M\Omega$).

La composición de la solución intracelular, con la cual se llenaron los microelectrodos de registro fue (en mM): 100 $CsCl_2$, 10 NaCl, 2 $MgCl_2$, 20 TEA-Cl, 5 ATP- Mg^{2+} , 0.3 GTP- Na^+ , 14 EGTA y 20 HEPES/CsOH (aproximadamente 270 miliosmoles, pH 7.3). En el experimento de la evaluación de la inactivación de la I Ca por Ca^{2+} el EGTA fue remplazado equimolarmente por BAPTA. En la modalidad de parche perforado se agregó a la solución interna 50-100 mg/ml de anfotericina-B como agente perforante.

Las rebanadas de tejido adrenal se acomodaron en el fondo de una cámara de registro ubicada en la platina de un microscopio invertido (Eclipse FNI, Nikon, Tokyo, Japón). La imagen de las rebanadas fue enviada hacia un monitor mediante una cámara CCD conectada al microscopio, los registros se realizaron observando la muestra con un objetivo de 40x. La rebanada en registro se mantuvo con perfusión constante de 1.5 ml/min de solución BBS normal con la siguiente composición en mM: 140 de NaCl, 2 de KCl, 2 de $CaCl_2$, 5 de $MgCl_2$, 26 de $NaHCO_3$ y 10 de Glucosa, gasificada continuamente con una mezcla de O_2 95% y CO_2 5%. El volumen al cual se mantuvo la cámara de registro fue de 0.5 ml.

Una vez identificada la célula a registrar, el microelectrodo se acercó lentamente hacia la célula por medio de un micromanipulador Sutter MPC-200 (Sutter Instruments), durante esta manipulación se aplicó presión positiva (expulsión) en el microelectrodo para evitar que se ensucie de la punta antes de llegar a la célula (resistencia 4 – 5 $M\Omega$); a medida que se acercó el microelectrodo a la célula y en el momento en el cual se tocó sutilmente la

membrana celular, se observó un ligero incremento en la resistencia del sello, en ese momento se quitó la presión positiva y se aplicó una ligera presión negativa (succión) para promover la generación de un sello de alta resistencia en el orden de al menos 1 Gigaohm ($G\Omega$) entre el microelectrodo y la membrana celular (Hamill y cols, 1981). Rápidamente se hizo la ruptura del pequeño parche formado entre la membrana y la punta del microelectrodo por medio de la aplicación de presión negativa. Al romper el pequeño parche se cancelaron los transitorios capacitivos y se compensó la resistencia en serie, en ese momento se logró la configuración de fijación de voltaje en célula entera y se mantuvo el voltaje de la célula a -90 mV.

En el caso del parche perforado, una vez que se obtiene el sello de alta resistencia, se deja que la anfotericina-B forme poros en la membrana celular hasta que se obtengan los transitorios capacitivos y que la resistencia en serie sea menor a $20 M\Omega$, esto ocurre entre 5 y 10 minutos después de haber logrado el sello.

Luego de obtener la configuración de fijación de voltaje, la solución que baña a la rebanada se cambió por una solución BBS con la siguiente composición en mM: 113 NaCl, 2.5 KCl, 10 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 26 $NaHCO_3$, 10 glucosa y 0.001 TTX gasificada constantemente con una mezcla de O_2 95 % y CO_2 5 %. Para activar la I_{Ca} se aplicó un pulso cuadrado despolarizante que va desde -90 mV (50 ms) a 0 mV (60 ms) y regresa a -90 mV (50 ms) cada 10 segundos hasta que la I_{Ca} que se genera durante el pulso alcanza la estabilidad. Debido a que nuestro objetivo es evaluar la I_{Ca}, las corrientes de K^+ y de Na^+ presentes en las células cromafines fueron bloqueadas. La I_K se bloqueó al tener TEA y $CsCl_2$ en el microelectrodo de registro, mientras que la I_{Na} se bloqueó al aplicar TTX en la solución extracelular.

3.2 RELACIÓN CORRIENTE-VOLTAJE (I-V)

El protocolo utilizado para la obtención de la relación corriente-voltaje fue el siguiente: Se dieron pulsos despolarizantes de -60 mV a $+40$ mV con una duración de 60 ms en escalones de 5 mV cada 10 segundos a partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV. Los valores de corriente obtenidos fueron evaluados a dos tiempos, al pico máximo de la corriente (a los primeros

5 ms, I_{Ca} transitoria) y 5 ms antes de finalizar el pulso de registro (I_{Ca} sostenida). Los valores de I_{Ca} se normalizaron al dividirlos entre la capacitancia de la célula para comparar la corriente por unidad de área, por lo que los resultados se muestran en densidad de corriente (pA/pF).

3.3 ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN DEPENDIENTE DE VOLTAJE DE LA I_{Ca}

Para evaluar la cinética de activación de la I_{Ca}, los valores de corriente se transformaron a conductancia por medio de la siguiente fórmula $g_{Ca} = I_{Ca} / (V_m - E_{Ca})$ en la cual g_{Ca} es la conductancia de Ca^{2+} , I_{Ca} es la amplitud de la corriente obtenida en cada pulso despolarizante, V_m es el voltaje despolarizante al cual se generó la I_{Ca} y E_{Ca} es el voltaje al cual se alcanza el equilibrio de la corriente que en estos experimentos se obtuvo por la extrapolación de la relación I-V (~ +60 mV). Los datos obtenidos de conductancia se graficaron en función del voltaje y se ajustaron mediante la aplicación de la ecuación de Boltzmann para la activación $g/g_{max} = \{1 + \exp [-(V - V_{a1/2})/k_a]\}^{-1}$ a partir del ajuste, se obtuvieron el valor medio de voltaje de activación ($V_{a1/2}$) y la pendiente de activación (k_a).

Para obtener los valores de inactivación de la corriente en el estado estacionario, se aplicó un pulso despolarizante a -20 mV (que activa el componente transitorio) y a +5 mV (que activa el componente sostenido), precedido de pulsos de voltaje de -100 hasta +10 mV de 1.5 segundos de duración en escalones de voltaje de 3 mV (componente transitorio) y 10 mV (componente sostenido) cada 10 segundos. Los datos de I_{Ca} obtenidos a los diferentes prepulsos de despolarización se dividieron entre los valores de I_{Ca} obtenidos a -100 mV y los resultados se graficaron en función del prepulso despolarizante y se ajustaron mediante la aplicación de la ecuación de Boltzmann para la inactivación $I/I_{max} = \{1 + \exp [-(V - V_{i1/2})/k_i]\}^{-1}$ a partir del ajuste, se obtuvieron el valor medio de voltaje de inactivación ($V_{i1/2}$) y la pendiente de inactivación (k_i).

3.4 CINÉTICA DE CIERRE DE LOS CANALES (DESACTIVACIÓN).

Para evaluar la cinética de cierre (desactivación) de los CCDV, se aplicó el siguiente protocolo: se aplicó un pulso despolarizante a -30, -25 o +5 mV durante 10, 4 o 50 ms para activar, respectivamente, la amplitud máxima de la I_{Ca} tipo T expresada en células HEK-293, el componente transitorio o el componente sostenido, a partir de un voltaje de mantenimiento de -90 mV, seguido por pulsos repolarizantes desde -110 hasta -40 mV en escalones de voltaje de 5 mV con 30 ms de duración cada 10 segundos. Este protocolo permite la activación máxima de la I_{Ca} y antes de que se inactive, la repolarización promueve que los CCDV pasen súbitamente al estado cerrado generándose una corriente remanente que se vuelve cero en cuanto los canales se han cerrado (cola de corriente). La cola de corriente generada se ajusta a una exponencial simple y se obtiene el valor tau (τ) que equivale al momento en que se alcanzó el 37% del cierre de los canales. Los valores obtenidos de τ se graficaron en función de los pulsos de voltaje aplicados y se interpretan como el valor que tardan en cerrar los canales a los diferentes voltajes aplicados.

3.5 INACTIVACIÓN DE LA I_{Ca} DEPENDIENTE DE CA²⁺

Para evaluar la inactivación de la I_{Ca} inducida por Ca²⁺, después de que se alcanzó el pico máximo de I_{Ca} se observó un decaimiento de la corriente, una vez que inició el decaimiento se realizó un ajuste por medio de una exponencial simple hasta que se terminó el pulso. A partir del ajuste se obtiene el valor τ de la cinética de inactivación dependiente de Ca²⁺ en función de los voltajes empleados.

En el experimento diseñado para evaluar la presencia de I_{Ca} tipo T, se utilizó la línea celular de riñón de embrión humano (HEK-293) que expresan establemente canales de Ca²⁺ tipo T (Ca_v3.2 o Ca_v3.3) amablemente donadas por el Dr. Juan Carlos Gómora Martínez del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las células expresaron la subunidad α 1H (Ca_v3.2) o α 1I (Ca_v3.3) de manera estable y fueron mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml estreptomycin para evitar contaminación y se mantuvieron en una

incubadora con atmósfera controlada a 37 °C, 95 % O₂ y 5 % CO₂. Durante las 24 a 48 horas de cultivadas se realizaron los experimentos.

4. EXTRACCIÓN DE RNAM Y SÍNTESIS DE DNAC.

Estos experimentos fueron realizados por el Dr. Ricardo González Ramírez y el Dr. Ricardo Félix Grijalva en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Norte del Instituto Politécnico Nacional.

Para la extracción total de RNAm y síntesis de DNAC, las glándulas suprarrenales de 6 ratas WKY, 6 Wistar y 3 SHR fueron seccionadas en rebanadas de 200 µm de grosor como anteriormente se describió. Bajo un microscopio estereoscópico, se separó la corteza y se obtuvo la parte correspondiente a la médula suprarrenal, la cual se colocó en Trizol para extraer el RNA. La calidad del RNA se determinó por medio de densidad óptica ($260/280=1.8$) mientras que la integridad se verificó por electroforesis de gel de agarosa.

Para sinterizar el DNAC se utilizó el RNA por medio de un kit de síntesis de DNAC Superscript III con primers oligo (dT) como lo indica el protocolo del kit. Se disolvió en 10 ml de agua tratada con dietil-pirocarbonato 2.5 mg de RNA, 2.5 mM de oligo (dT), 0.5 mM de cada dNTP. Después del alineamiento a 65 °C por 5 min, se agregó el buffer superscript, 40 unidades de RNaseOUT, 5mM de DTT, 5 mM de MgCl₂ y 200 unidades del Superscript III y la solución se incubó a 55 °C durante 1 hora. Finalmente, la solución se incubó a 85 °C durante 5 min para inactivar la enzima. Como control, paralelamente se corrieron muestras de cada RNA en ausencia de Superscript III para evaluar cualquier contaminación del DNA.

4.1 PCR EN TIEMPO REAL

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) en tiempo real mediante la prueba TaqMan utilizando los primers y la prueba reportados por el grupo de Singh y cols, 2008; designado para sobrelapar regiones conservadas de las variantes del canal Ca_v1.3 (longitud

completa del exon 42 ($Ca_v1.3_{42}$) y carboxilo terminal corto 42A ($Ca_v1.3_{42A}$). Los niveles del transcrito se estimaron con el método CT (Livak y Schmittgen 2001). Como control endógeno, se llevó a cabo el análisis del gen del RNA ribosomal eucariote 18 S.

Las reacciones cuantitativas de amplificación de PCR en tiempo real por prueba TaqMan se llevó a cabo en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad). Las reacciones se realizaron en 25 ml de la mezcla de reacción que consistió de 12.5 ml de la mezcla TaqMan Universal PCR Master (Applied Biosystems), 0.9 mM de primers y 0.25 mM de la prueba TaqMan para cada una de las variantes del canal $Ca_v1.3$. La mezcla master con los primers y la prueba se agitaron en vortex y 15 ml de la mezcla se depositó en una placa para PCR de 96 pozos de 0.2-ml de grado óptico (Applied Biosystems). Subsecuentemente se agregó 10 ml del templado de DNAC a un volumen final de 25 ml. Las condiciones térmicas del ciclado fueron como se indica a continuación: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, seguido por 60 ciclos, 95 °C por 15 s para desnaturalización y 60 °C por 1 min para la alineación y la extensión.

VII. RESULTADOS.

SECCIÓN I. COMPARACIÓN DE LA ICA EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA WKY Y SHR.

1. PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS SHR Y WKY.

En la tabla 2 se muestran los valores de la presión arterial de las ratas utilizadas en este trabajo. Los valores de presión arterial sistólica del grupo SHR son similares a los reportados por Lee en 1991, a este periodo de edad aproximadamente oscilan en 150 mm Hg.

Tabla 2. Valores promedio de presión arterial obtenidos de ratas WKY y SHR. * $p < 0.0001$

	Pulsos/min	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)	Media
WKY n = 15	351.6 ± 8.2	111.2 ± 2.0	81.4 ± 1.5	91.0 ± 1.2
SHR n = 16	438.4 ± 10.8 *	147.1 ± 3.2 *	108.7 ± 4.2 *	121.6 ± 3.9 *

2. ICA EN CÉLULAS CROMAFINES DE GLÁNDULA SUPRARRENAL DE RATAS WKY Y SHR.

En el momento en que se logró la configuración de fijación de voltaje en célula completa, la rebanada de glándula suprarrenal en registro se profundió con una solución BBS que contenía TTX para bloquear la corriente de Na^+ , mientras que la corriente de K^+ se bloqueó al utilizar Cs^{2+} y TEA en la solución intracelular (ver materiales y métodos). A partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV se aplicaron pulsos despolarizantes para activar la ICa.

La figura 9 (A, B) muestra los trazos de la ICa obtenida a los diferentes pulsos de despolarización en células cromafines de ratas WKY y SHR. En ambas cepas se observa un componente transitorio rápido inactivante, el cual se distingue principalmente a potenciales negativos (-30 a -10 mV) y queda un componente sostenido; mientras que a potenciales positivos (0 a +30 mV) predomina un componente sostenido no inactivante. Por tal razón se evaluó la amplitud de la corriente durante los primeros 5 ms (componente transitorio) y 5

ms antes de terminar el pulso de prueba (componente sostenido) como se indica con las líneas punteadas (figura 19 A,B).

La I_{Ca} se normalizó al dividir su amplitud entre la capacitancia de las células para obtener la densidad de corriente y poder comparar la corriente entre células de diferente tamaño. Los valores promedio de capacitancia entre ambas cepas no mostraron diferencia significativa 8.1 ± 1.1 pF en WKY (n=19 cél) y 7.8 ± 1.2 pF en SHR (n= 19 cél; p=0.41).

Los valores promedio de la densidad de corriente de 19 células por cada cepa se graficaron en función del voltaje (curvas I-V) como se muestra en la figura 9 (C, D). El componente transitorio se activó entre -45 mV o -40 mV, alcanzó su amplitud máxima a -5 mV y su voltaje de inversión por extrapolación de la curva es entre +50 o +60 mV en ambas cepas. Por otra parte, el componente sostenido se activó entre -35 o -30 mV, alcanzó su amplitud máxima a +5 mV y su voltaje de inversión, por extrapolación de la curva, fue aproximadamente +50 o +60 mV en ambas cepas. Los datos no mostraron diferencias significativas en la densidad de corriente entre los componentes transitorios de ambas cepas en la amplitud máxima de la corriente (-5 mV) 61.7 ± 3.2 pA/pF en WKY y 55.5 ± 4.9 pA/pF en SHR (p=0.29); por otra parte, el componente sostenido tampoco mostró diferencias significativas entre ambas cepas en la amplitud máxima de la corriente (+5 mV) 40.7 ± 2.1 pA/pF en WKY y 35.7 ± 3.6 pA/pF en SHR (p=0.23).

Estos resultados indican que la cinética de activación de la I_{Ca} , así como la densidad de I_{Ca} en células cromafines de ratas SHR y WKY son semejantes.

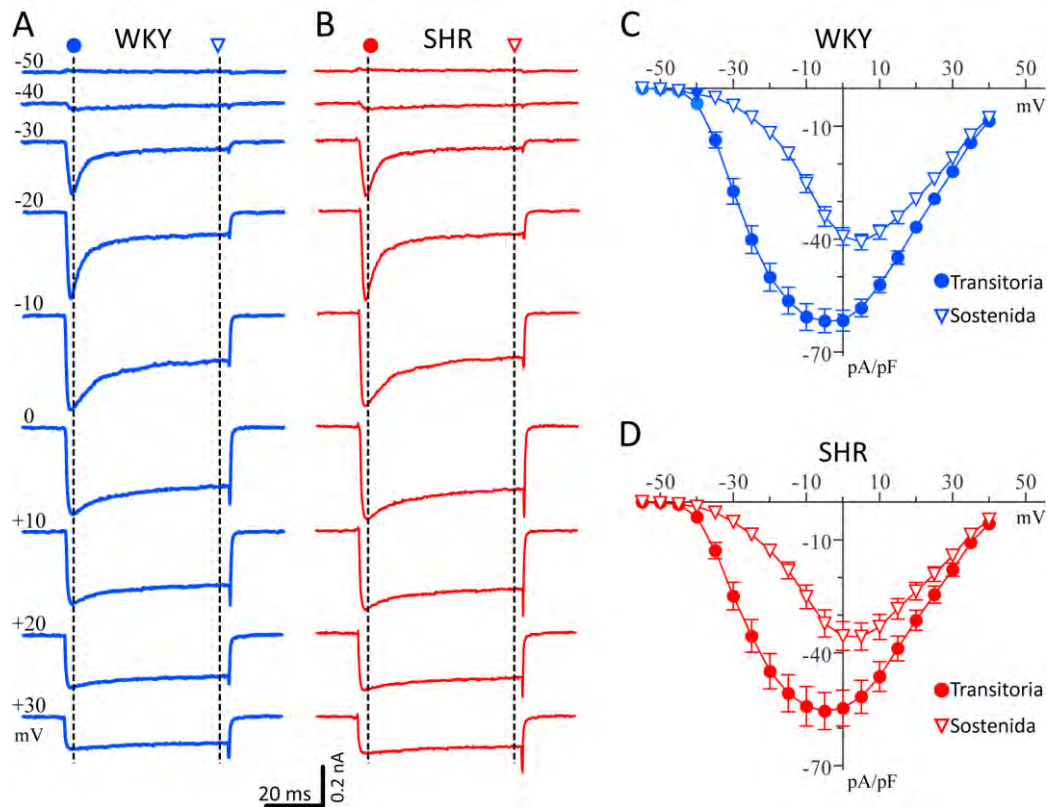


Figura 9. ICa en células cromafines de ratas WKY y SHR. A, B) Familia de registros representativos de ICa de células cromafines de rata WKY (azul) y SHR (rojo). Las líneas punteadas indican el momento en el que se evaluó la amplitud de la corriente. **C, D)** Curvas I-V de la ICa transitoria y sostenida de células cromafines de ratas WKY (n=19 cél) y SHR (n=19 cél), respectivamente. Los datos se presentan como densidad de corriente.

3. EL COMPONENTE TRANSITORIO DE ICA NO SE OBSERVA EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA WISTAR.

Interesantemente, el registro de ICa en células cromafines de rata Wistar bajo las mismas condiciones de registro (figura 10) no muestra componente transitorio. Esto coincide con los resultados obtenidos en células cromafines de ratón en las mismas condiciones de registro (Hernández y cols, 2011).

La figura 10 (A, B) compara los registros de la ICa en células cromafines de rata WKY (que son similares a los de SHR) con los de rata Wistar, con la finalidad de distinguir la inactivación de la ICa observada en la cepa WKY o SHR. Los datos de la amplitud de la corriente se normalizaron al dividir entre la capacitancia de las células, que fueron 8.6 ± 0.6 y 8.1 ± 1 pF para Wistar y WKY, respectivamente ($p = 0.5$); y se graficaron en función del voltaje del pulso. Las curvas I-V muestran la comparación de la densidad de corriente

evaluada al pico máximo y 5 ms antes de terminar el pulso de prueba (líneas punteadas de figura 10 A). Nótese que la densidad de corriente al inicio del pulso no es diferente (figura 10 C) se activó alrededor de -45 mV, alcanzó la amplitud máxima a -5 mV y la inversión de la corriente por extrapolación de la curva, es aproximadamente a +50 mV. La amplitud máxima no muestra diferencia significativa 66.5 ± 6.6 pA/pF para WKY (n=19 cél) y 61.7 ± 3.2 pA/pF para Wistar (n=9 cél; p = 0.46).

Por otra parte, el componente sostenido mostró el mismo voltaje de activación -35 mV, y el mismo voltaje de reversión de la corriente (~ +50 mV); sin embargo, la amplitud máxima se alcanzó a 0 mV en Wistar y +5 mV en WKY (figura 10 D). Además, en voltajes negativos (-35 a -10 mV) se alcanzó la mayor proporción de corriente inactivada, siendo el mayor (~ 65 %) a -25 mV, 7.67 ± 0.8 pA/pF en WKY y 24.54 ± 4.4 pA/pF en Wistar.

Estos resultados muestran que en células cromafines de rata WKY y SHR existe inactivación de la ICa que típicamente no se observa en células cromafines de otros roedores.

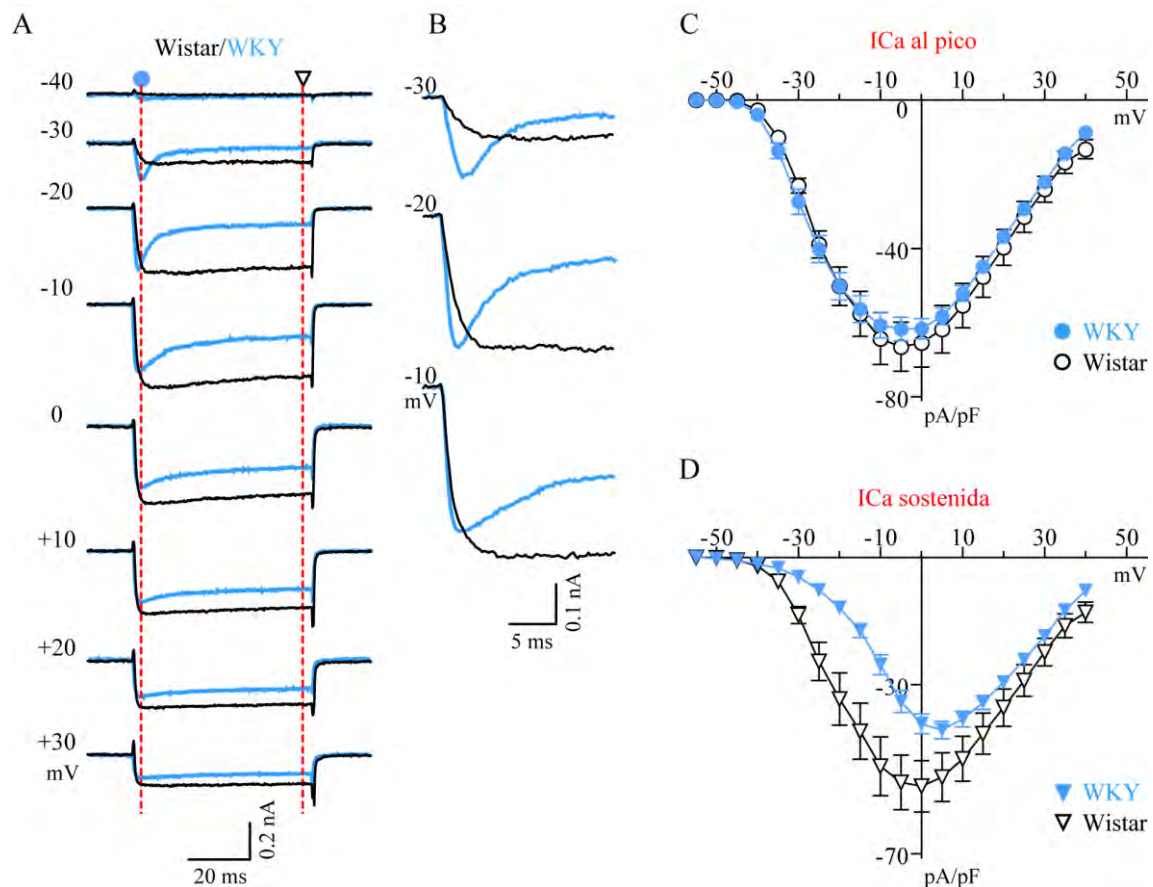


Figura 10. Comparación de la ICa en células cromafines de WKY con la cepa normotensa Wistar. A) Registros representativos de ICa en células cromafines de rata Wistar (negro) y WKY (azul) activadas a diferentes voltajes. **B)** Acercamiento de los primeros 15 ms del registro de la ICa en voltajes negativos donde se distingue principalmente la inactivación de la corriente en WKY. **C)** Curva I-V evaluada al pico máximo en ambas cepas. **D)** Curva I-V del componente sostenido en ambas cepas, nótese que a voltajes negativos la amplitud de la ICa es menor en WKY (n=19 cél) respecto a Wistar (n=9 cél).

4. DEPENDENCIA DEL VOLTAJE EN ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN DE ICA EN WKY Y SHR.

Para evaluar la dependencia del voltaje en la activación de la ICa, los valores de corriente obtenidos (figura 9) se convirtieron a valores de conductancia mediante la siguiente ecuación $g_{Ca} = I_{Ca}/(V_m - E_{Ca})$; (ver materiales y métodos). Los valores de conductancia se graficaron en función del voltaje de prueba y se ajustaron con la ecuación de Boltzmann para la activación $g/g_{max} = \{1 + \exp[-(V - V_{a1/2})/k_a]\}^{-1}$ (ver materiales y métodos). Los valores de voltaje medio de activación fueron: Componente transitorio $V_{a1/2}$ -19.6 y -20.1 mV; y los valores de pendiente k_a 9.5 y 9.15 mV. Componente sostenido $V_{a1/2}$ -6.2 y -9.1 mV; y los valores de pendiente k_a 7.5 y 7.0 mV; para WKY y SHR, respectivamente. El análisis de los datos muestra que no existe diferencia significativa en los parámetros $V_{a1/2}$ y k_a entre ambas cepas ($p=0.52$ y $p=0.6$); sin embargo, los valores $V_{a1/2}$ y k_a entre ambos componentes son estadísticamente diferentes ($p<0.0001$ y $p<0.0006$) por lo que en las cepas SHR y WKY se sugiere la activación de dos componentes diferentes de la ICa (figura 11 A).

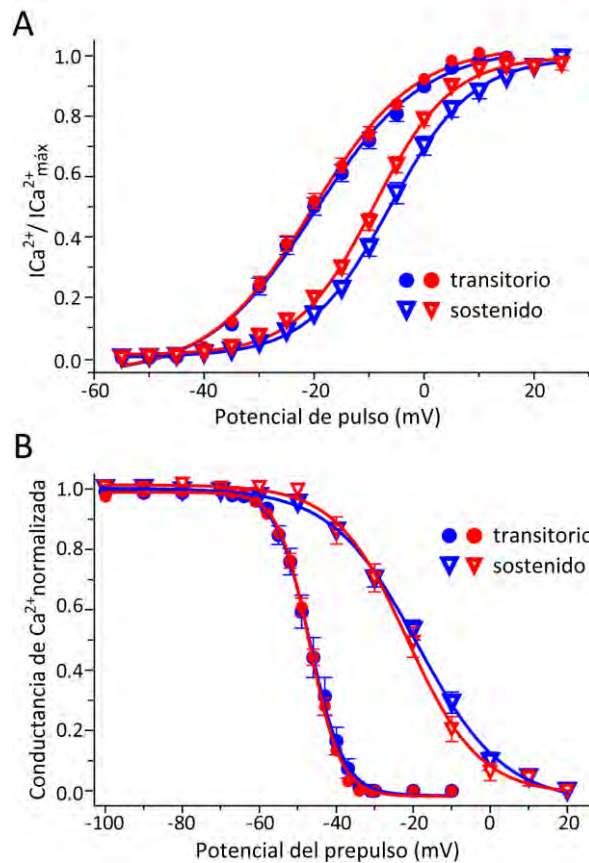


Figura 11. Dependencia del voltaje en activación e inactivación de la ICa en WKY y SHR.

A) Los valores de conductancia se graficaron en función del pulso despolarizante y se ajustaron mediante la ecuación de Boltzmann para la activación del componente transitorio (círculos) y sostenido (triángulos) de la ICa en WKY (azul; n=19 células) y SHR (rojo; n=19 células). **B)** Los datos de corriente fueron normalizados entre la corriente máxima activada al pulso de prueba y se graficaron en función del potencial del prepulso. Los datos se ajustaron mediante la ecuación de Boltzmann para la inactivación del componente transitorio (círculos) y sostenido (triángulos) de la ICa en WKY (azul; n=19 células) y SHR (rojo; n=19 células).

Para obtener los valores de inactivación de la corriente en el estado estacionario, se aplicaron pulsos de prueba a -20 mV (componente transitorio) y a +5 mV (componente sostenido), precedidos de un pulso de 1.5 segundos de duración desde un voltaje de -100 hasta +10 mV en escalones de voltaje de 3mV (componente transitorio) y 10 mV (componente sostenido) cada 10 segundos. Los valores de ICa obtenidos en el pulso de prueba después de los diferentes pre-pulsos despolarizantes se dividieron entre el valor de la ICa obtenido a -100 mV (máxima amplitud). Los resultados se graficaron en función del prepulso despolarizante y se ajustaron por medio de la ecuación de Boltzmann para la inactivación $I/I_{max} = \{1 + \exp [-(V-V_{i1/2})/k_i]\}^{-1}$ (ver materiales y

métodos). Los valores de voltaje medio de inactivación fueron: Componente transitorio $V_{i1/2}$ -46.9 y -46.8 mV; y los valores de pendiente: k_i 4.0 y 4.3 mV. Componente sostenido $V_{i1/2}$ -20.8 y -18.8 mV; y los valores de pendiente k_i 9.8 y 9.8 mV; para WKY y SHR, respectivamente (figura 11). El análisis de los datos muestra que no existe diferencia significativa para los parámetros $V_{i1/2}$ y k_i entre ambas cepas ($p=0.8$ y $p= 0.23$); sin embargo, los valores $V_{i1/2}$ y k_i entre ambos componentes son estadísticamente diferentes ($p<0.0001$ en ambos casos).

Hasta aquí, los resultados muestran la presencia de dos componentes con diferente dependencia de voltaje, uno transitorio que podría ser originado por I_{Ca} tipo T y otro sostenido que puede corresponder a I_{Ca} tipo L, N, P-Q y R en ambas cepas. Importantemente, la dependencia de voltaje en la activación e inactivación del componente transitorio y del componente sostenido son similares entre las cepas SHR y WKY.

5. ¿EL COMPONENTE TRANSITORIO SE DEBE A LA ACTIVACIÓN DE I_{Ca} TIPO T?

Como anteriormente se demostró, el componente transitorio *no se observa* en células cromafines de otra cepa de rata normotensa (Wistar) o en ratón (Hernández y cols, 2011) bajo las mismas condiciones de registro. Esto es importante debido a que puede ser I_{Ca} tipo T, de la cual existen pocos reportes de su presencia en células cromafines. Para comprobar dicha hipótesis se obtuvieron las relaciones I-V en situación control y en presencia de 50 μM de Ni^{2+} , está reportado que a esa concentración bloquea la I_{Ca} tipo T en células cromafines en cultivo (Novara y cols, 2004; Carabelli y cols, 2007).

Los resultados del efecto de Ni^{2+} se muestran en las curvas I-V de 7 células por cada cepa en la figura 12, una proporción del componente transitorio fue inhibido en presencia de Ni^{2+} , sin embargo también afectó parte del componente sostenido. El componente transitorio disminuyó entre 50 y 60 % a voltajes negativos (-40 y -20 mV), mientras que a voltajes menos negativos (-10 a +30 mV) disminuyó entre 25 a 40 % (figura 12 C) el efecto fue similar en ambas cepas. Por otra parte, el componente sostenido disminuyó entre 25 a 50 % en presencia de Ni^{2+} (figura 12 F), lo cual sugiere un efecto inespecífico que probablemente afectó otros subtipos de CCDV. Este resultado no permite

concluir que la ICa tipo T origina el componente transitorio en estas cepas. En la sección II se muestran más resultados a este respecto.

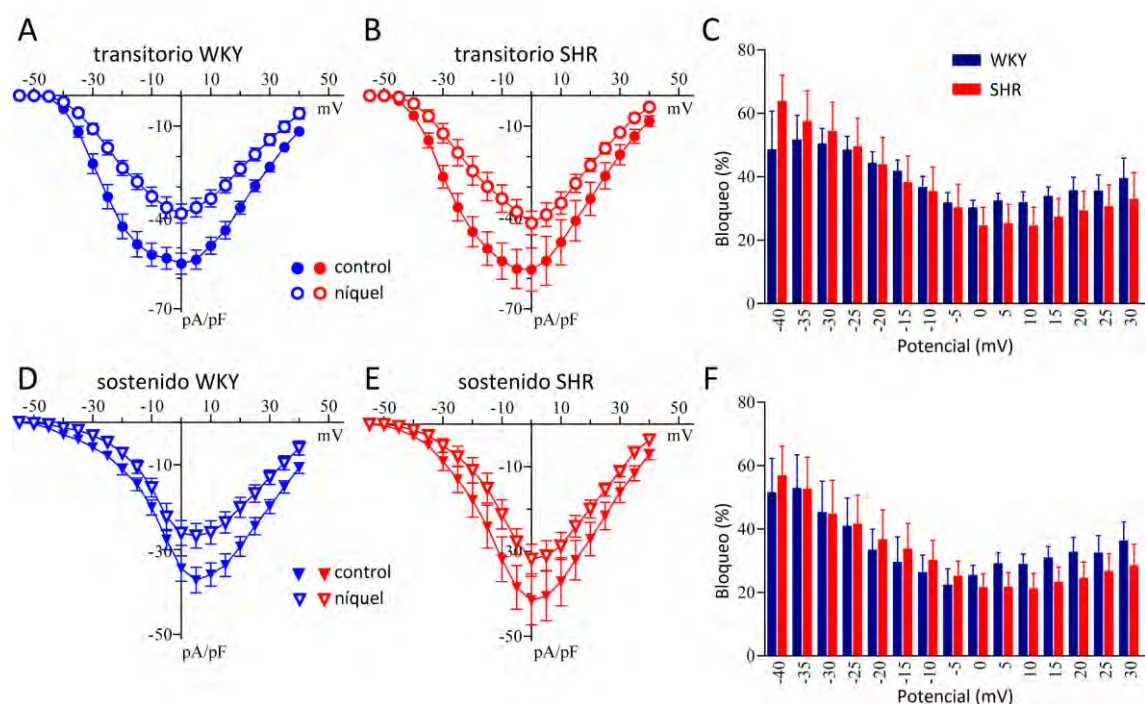


Figura 13. Efecto de Ni²⁺ en la ICa. **A, B)** Efecto de Ni²⁺ en la amplitud de la corriente transitoria de WKY (n=7 cél) y SHR (n=7 cél), respectivamente. **C)** Porcentaje de bloqueo de Ni²⁺ sobre el componente transitorio en función del voltaje en WKY (azul) y SHR (rojo). **D, E)** Efecto de Ni²⁺ en la amplitud del componente sostenido de WKY y SHR; respectivamente. **F)** Porcentaje de bloqueo de Ni²⁺ sobre el componente sostenido en función del voltaje en WKY (azul) y SHR (rojo).

6. PROPORCIÓN DE ICA TIPO L EN CÉLULAS CROMAFINES DE RATA WKY Y SHR.

La siguiente estrategia consistió en determinar la proporción de ICa tipo L en las células cromafines de ambas cepas mediante la aplicación del bloqueador específico nifedipina. La figura 13 muestra la curva I-V de 7 células por cada cepa en condición control y en presencia de 5 μM de nifedipina. De manera importante, el componente transitorio se inhibió entre 70 y 80 % en voltajes negativos (-40 a -20 mV; figura 13 C), que es cuando sobresale el componente transitorio, mientras que al pico máximo de la ICa del componente transitorio se inhibió 43.8 + 6.5 y 45.0 + 2.3 % en WKY y SHR respectivamente. De la misma forma, nifedipina inhibió entre 80 y 90 % del componente sostenido de la ICa en voltajes negativos (-40 a -20 mV; figura 13 F), mientras

que al pico máximo del componente sostenido inhibió 33.3 ± 7.8 y 41.6 ± 4.1 % en WKY y SHR respectivamente. Aunque a voltajes positivos (+10 a +30 mV) pareciera haber un mayor bloqueo en las células cromafines de ratas SHR (figura 13 C, F), no se encontró diferencia significativa. El componente transitorio interesantemente disminuyó en presencia de nifedipina; sin embargo, se requieren mas experimentos para descifrar si el componente transitorio corresponde a I_{Ca} tipo L (ver sección II).

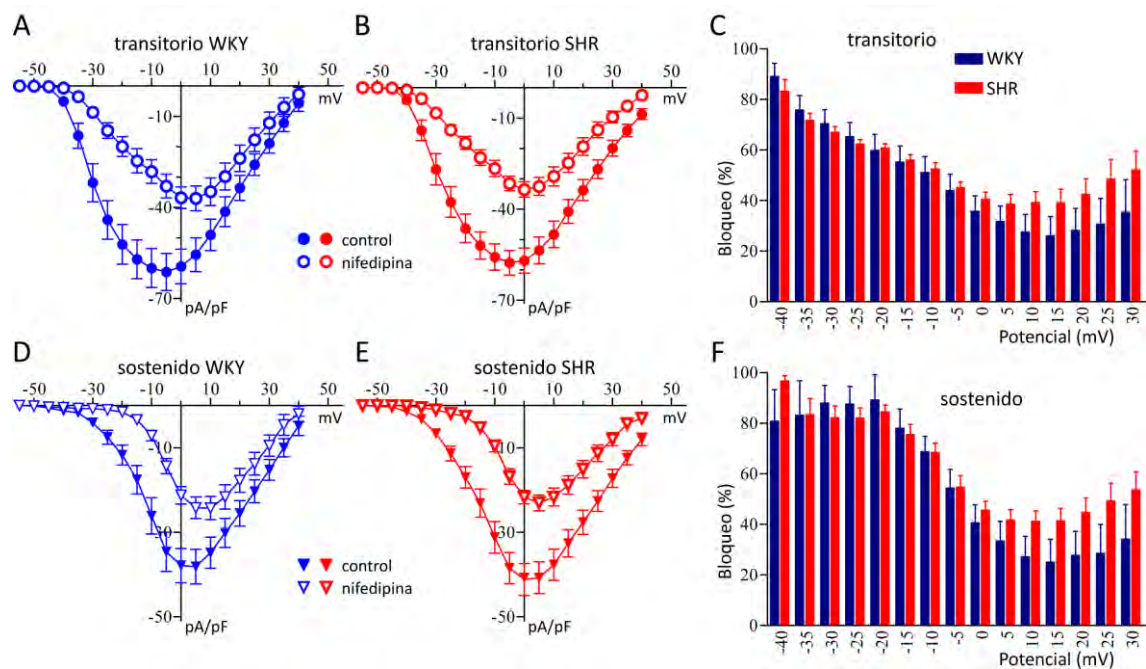


Figura 13. Efecto de nifedipina en I_{Ca}. **A, B)** Efecto de nifedipina en la amplitud de la corriente transitoria de WKY (n=7 cél) y SHR (n=7 cél); respectivamente. **C)** Porcentaje de bloqueo de nifedipina sobre el componente transitorio en función del voltaje en WKY (azul) y SHR (rojo). **D,E)** Efecto de nifedipina en la amplitud del componente sostenido de WKY y SHR; respectivamente. **F)** Porcentaje de bloqueo de nifedipina sobre el componente sostenido en función del voltaje en WKY (azul) y SHR (rojo).

En esta primera sección encontramos que no hay diferencia significativa en la densidad de I_{Ca} macroscópica entre células cromafines de ratas normotensas WKY e hipertensas SHR. En ambas cepas se observó análogamente un componente transitorio y un componente sostenido con la misma cinética de activación e inactivación dependiente de voltaje. También se determinó que el efecto de Ni²⁺ y nifedipina fue similar en ambas cepas. Por lo

tanto, en algunos experimentos decidimos agrupar los resultados obtenidos presentándolos como WKY/SHR.

SECCIÓN II. DILUCIDACIÓN DEL ORIGEN DEL COMPONENTE TRANSITORIO DE ICA.

1. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE ICA TIPO T EN WKY/SHR.

Debido a que la aplicación de Ni^{2+} no permitió obtener resultados concluyentes acerca de la posible contribución de ICA tipo T, decidimos utilizar un análogo de mibefradil, NNC 55-0396, compuesto diseñado para bloquear específicamente los CCDV de tipo T (Huang y cols, 2004).

Previamente, para determinar si NNC 55-0396 bloquea la ICA tipo T, se utilizó la línea celular HEK-293 que expresa establemente al canal $Ca_v3.2$ o $Ca_v3.3$. En la figura 14 se muestra el curso temporal del efecto de $10 \mu M$ de NNC 55-0396 sobre la ICA tipo T, a esa concentración se bloqueó totalmente la ICA tipo T (figura 14 A,B). El efecto del fármaco muestra que es una inhibición reversible, aunque no se recuperó el 100 % de la ICA durante el periodo de registro. Con base en este resultado decidimos evaluar el efecto de NNC 55-0396 sobre la ICA de células cromafines de ratas WKY/SHR.

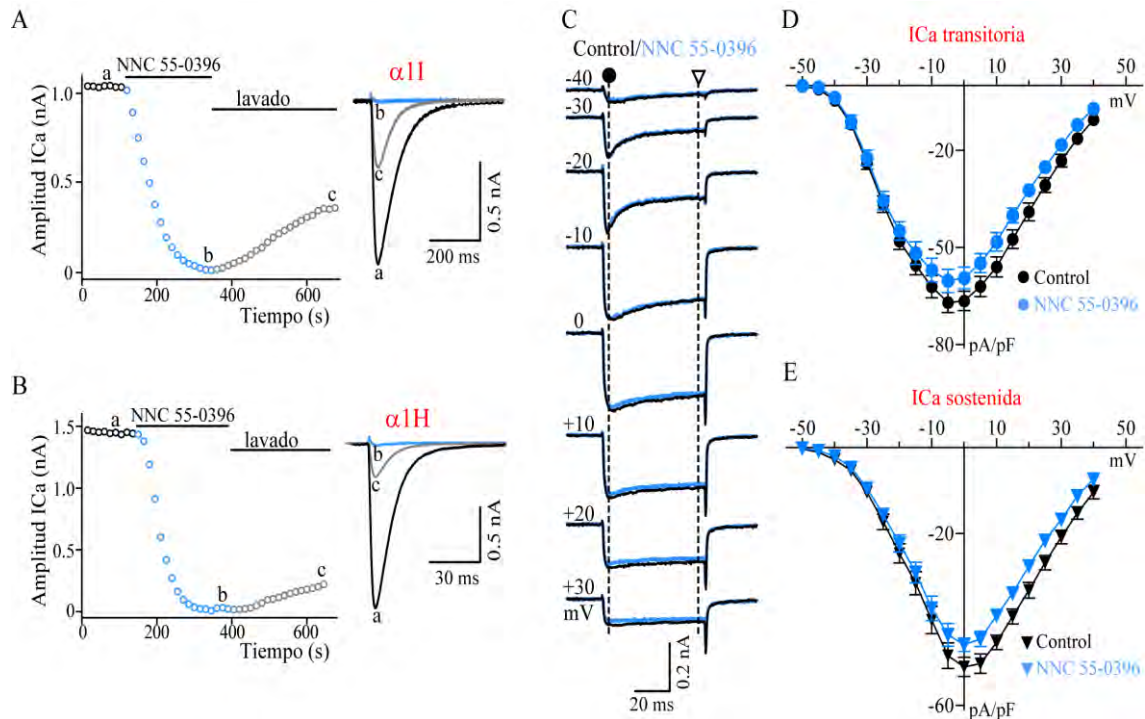


Figura 14. Efecto de NNC 55-0396 en ICa. **A, B)** Curso temporal del efecto de NNC 55-0396 en la ICa tipo T de $Ca_v3.3$ ($\alpha1I$) y $Ca_v3.2$ ($\alpha1H$), respectivamente; expresados establemente en la línea celular HEK-293. **C)** Registros representativos de ICa en situación control (negro) y en presencia de NNC 55-0396 (azul) en las células cromafines de ratas WKY/SHR. **D, E)** Curvas I-V del efecto de la aplicación de NNC 55-0396 en el componente transitorio y sostenido; respectivamente ($n=6$ cél; WKY 3, SHR 3).

En la figura 14 C se observa que la aplicación de $10 \mu\text{M}$ de NNC 55-0396 no afectó los trazos de ICa de las células cromafines; en la curva I-V se observó que en 6 células evaluadas NNC 55-0396 no afecta la ICa, sugiriendo que la ICa tipo T no participa en las células cromafines de ratas WKY/SHR. Sin embargo, este dato contrasta con lo observado al aplicar Ni^{2+} , donde se observó disminución de los componentes transitorio y sostenido (figura 12). Para resolver esta controversia, decidimos evaluar la cinética del cierre (desactivación) de los CCDV. Está demostrado que la desactivación de los CCDV tipo T es lenta ($2 - 8$ ms entre -110 a -60 mV) comparada a la de CCDV de alto umbral de activación, por lo tanto, si la desactivación del componente transitorio es lenta, ayudaría a aclarar la probable presencia de CCDV tipo T en las células cromafines de ratas WKY y SHR. Primero determinamos el tiempo de desactivación de $Ca_v3.2$ en las células HEK 293, mediante el protocolo de cola de corriente (ver materiales y métodos; figura 15 A), como se muestra en

la figura 15 se graficó el valor tau (τ) del ajuste del decaimiento de la I_{Ca} en función de los diferentes voltajes aplicados (ver materiales y métodos). Se obtuvo que el valor más rápido de la desactivación se presenta al voltaje de -110 mV (2.4 ms); mientras que el valor más lento se obtuvo a -60 mV (8.2 ms). Estos resultados coinciden con los reportados en la bibliografía. Valores similares se han reportado para Ca_v3.1 y Ca_v3.3 (Cribbs y cols, 2000).

En caso de que el componente transitorio observado en las células cromafines de ratas WKY/SHR tuviese una contribución de I_{Ca} tipo T, la cinética de desactivación al activar el componente transitorio debería ser similar al observado en la línea celular HEK-293 que expresa Ca_v3.2 y debería ser más lento comparado a cuando se activa el componente sostenido.

Después de aplicar los protocolos correspondientes para la desactivación de cada componente (ver materiales y métodos; figura 16 C,D) se graficaron los valores de τ obtenidos de la cinética de desactivación del componente transitorio y sostenido en función del voltaje evaluado; interesantemente, no se observó diferencia en los valores obtenidos entre ambos componentes. La cinética de desactivación es más rápida a la observada en la I_{Ca} tipo T a los diferentes voltajes aplicados. El valor más rápido de la desactivación sucede al voltaje de -105 mV (0.23 ms); mientras que el valor más lento se obtuvo a -40 mV (0.55 ms). Estos resultados permiten concluir la ausencia de CCDV tipo T en las células cromafines de ratas WKY y SHR.

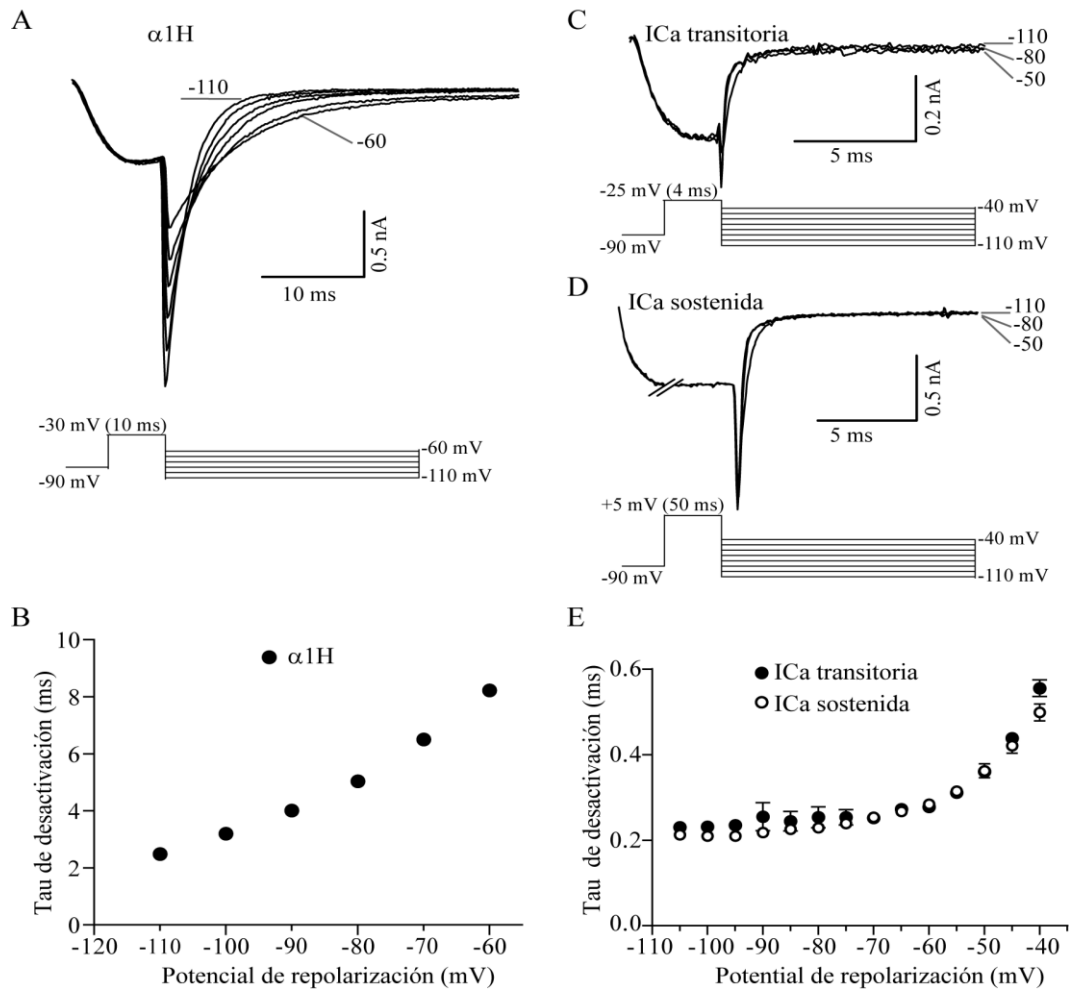


Figura 15. Desactivación de la ICa. **A)** Registros representativos de la desactivación de la ICa de $Ca_v3.2$ expresada establemente en la línea celular HEK-293 a partir del protocolo indicado en el panel inferior. **B)** Valores de τ obtenidos a partir de los trazos en A, graficados en función del potencial de repolarización ($n=2$ cél). **C)** Registros representativos de la desactivación de la ICa transitoria a partir del protocolo mostrado en el panel inferior. **D)** Registros representativos de la desactivación de la ICa sostenida a partir del protocolo mostrado en el panel inferior. **E)** Valores de τ obtenidos a partir de los trazos en C y D graficados en función del potencial de repolarización ($n=5$ cél).

Recapitulando, la aplicación de Ni^{2+} como bloqueador de la ICa tipo T afectó la ICa inespecíficamente; sin embargo, al utilizar NNC 55-0396 que bloquea específicamente ICa tipo T, no se obtuvo efecto en la ICa de células cromafines de ratas WKY/SHR. Importantemente, la evaluación de la cinética de desactivación de la ICa demostró equivalencia entre el componente transitorio y sostenido, presentando valores de desactivación rápidos respecto a $Ca_v3.2$. Estos datos demuestran que la ICa transitoria no corresponde a la activación de ICa tipo T en células cromafines de ratas WKY/SHR.

2. ¿ES ICA TIPO L LA QUE PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN DEL COMPONENTE TRANSITORIO?

Debido a que se demostró que la aplicación de nifedipina disminuyó de manera importante el componente transitorio y el componente sostenido de la I_{Ca} (figura 13 y 16 A); además, como la cinética de desactivación de ambos componentes es igualmente rápida comparada a la de I_{Ca} tipo T; podemos pensar que el componente transitorio se debe a la activación de I_{Ca} tipo L. Para poner a prueba dicha hipótesis, ahora utilizamos un agonista selectivo de la I_{Ca} tipo L Bay-K 8644, el cual promueve que los CCDV tipo L permanezcan más tiempo abiertos induciendo un mayor influjo de iones Ca^{2+} e incrementando la amplitud de la corriente. Los registros representativos de la figura 16 A ejemplifican el efecto de la inhibición de la I_{Ca} transitoria y sostenida por nifedipina, mientras que los registros representativos de la figura 16 B muestran que la aplicación de Bay-K 8644 incrementa la amplitud de la I_{Ca} total sin afectar la cinética de inactivación de la corriente, es decir, el componente transitorio y el sostenido se mantienen, solo que con una amplitud mayor. La curva I-V resume el efecto de Bay-K 8644 en 7 células demostrando que la amplitud de la I_{Ca} incrementó en ambos componentes (transitorio y sostenido) en los rangos negativos de voltaje (-45 a -5 mV) sin tener efecto significativo en voltajes positivos.

La inhibición de la amplitud del componente transitorio con nifedipina y el incremento obtenido con la aplicación de Bay-K 8644, así como su cinética rápida de desactivación, sugieren que el componente transitorio corresponde a la activación de I_{Ca} tipo L; sin embargo, surge la controversia de ser transitoria, pues la I_{Ca} tipo L se caracteriza por inactivarse más lentamente.

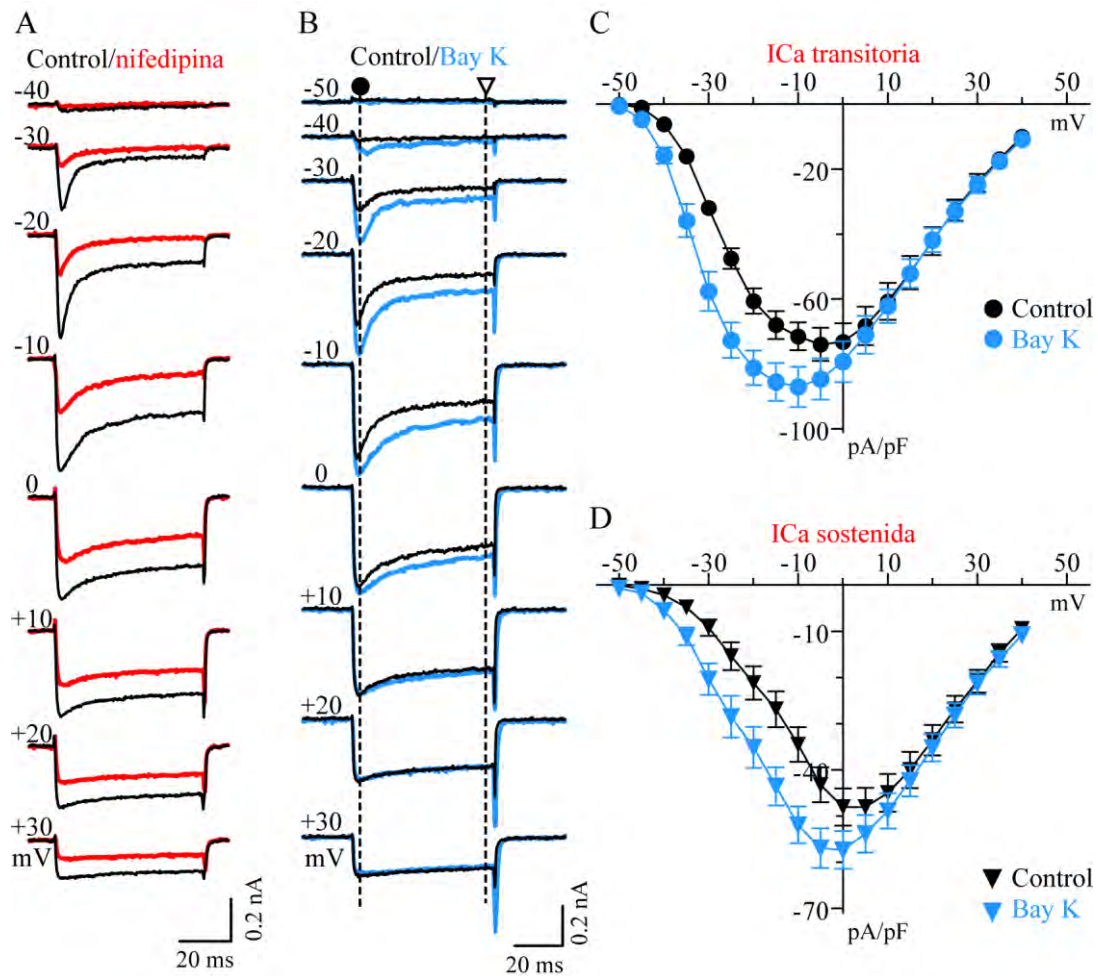


Figura 16. Nifedipina inhibe el componente transitorio y Bay K-8644 lo incrementa. A) Registros representativos del efecto de nifedipina (rojo) en la ICa de células cromafines de ratas WKY/SHR. **B)** Registros representativos del efecto de 1 μ M Bay K-8644 (azul) en la ICa de células cromafines de ratas WKY/SHR. **C, D)** Curvas I-V del efecto de Bay K-8644 en la ICa transitoria y sostenida; respectivamente (n=7 cél).

3. ¿LA INACTIVACIÓN DE LA ICA EN CÉLULAS CROMAFINES DE WKY/SHR ES DEPENDIENTE DE Ca^{2+} ?

Como ya se ha mencionado, las células cromafines expresan CCDV tipo L $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$; aproximadamente 45 a 50% del total de la ICa es acarreada a través de estos canales en células cromafines de roedores. En ratón aproximadamente 20 % de la ICa tipo L es acarreada por $Ca_v1.2$ mientras que 80 % es acarreada por $Ca_v1.3$. Los canales $Ca_v1.3$ se activan a potenciales más negativos que otros tipos de CCDV tipo L, además presentan una cinética de activación más rápida. Importantemente, se han descrito dos variantes que

se generan por splicing alternativo de $Ca_v1.3$, una variante que expresa el gen del exón 42 completo denominada $Ca_v1.3_{42}$ y otra variante que expresa el gen del exón 42 con el carboxilo terminal corto denominada $Ca_v1.3_{42A}$. Interesantemente, en el trabajo realizado por Singh y cols, en 2008, se demostró la importancia del carboxilo terminal del exón 42 en la regulación de la inactivación de la ICa dependiente de Ca^{2+} . La variante $Ca_v1.3_{42A}$ se caracteriza por activarse a voltajes negativos de aproximadamente -40 mV e interesantemente presenta inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} (Singh y cols, 2008), por lo cual se activa e inactiva rápidamente. Tal inactivación es similar a la observada en células cromafines de rata WKY/SHR. Por lo tanto, en el siguiente experimento evaluamos si la inactivación observada en el componente transitorio es dependiente de Ca^{2+} , lo que nos sugeriría la presencia de la variante $Ca_v1.3_{42A}$ en células cromafines de ratas WKY/SHR.

Para determinar si la inactivación de la ICa transitoria es un fenómeno dependiente de Ca^{2+} comparamos la cinética de inactivación de la corriente utilizando EGTA en la solución intracelular, el cual es un quelante de Ca^{2+} . Si la inactivación de la ICa es dependiente de Ca^{2+} el uso de BAPTA en la solución intracelular, el cual es un quelante de Ca^{2+} que lo atrapa más rápidamente comparado al EGTA, disminuirá la velocidad de inactivación de la corriente. En la figura 17 A se observa que cuando se utilizó BAPTA disminuyó la velocidad de la inactivación de la ICa transitoria. El valor τ de la inactivación se graficó en función del voltaje cuando sobresale el componente transitorio y como se observa, la velocidad de inactivación de la ICa transitoria es doblemente rápida cuando se utiliza el EGTA. Estos resultados sugieren que la inactivación de la ICa es un evento dependiente de Ca^{2+} en las células cromafines de ratas WKY/SHR.

Alternativamente, para sustentar la propuesta de que la inactivación es dependiente de Ca^{2+} , se utilizó Ba^{2+} como acarreador de carga sustituyendo al Ca^{2+} en la solución extracelular. Está demostrado que el Ba^{2+} fluye a través de los CCDV, pero no promueve la inactivación que produce el Ca^{2+} . Los resultados se muestran en la figura 17 B, como se puede ver en los trazos representativos, el uso de Ba^{2+} en lugar de Ca^{2+} incrementa la amplitud de la corriente y como se esperaba, la inactivación del componente transitorio se pierde por completo, por lo que resulta inviable realizar el ajuste de la

inactivación, pues se vuelve casi una línea recta. Estos resultados refuerzan lo observado cuando se utilizó BAPTA en lugar de EGTA en la solución intracelular. Por lo tanto, la inactivación del componente transitorio es un evento dependiente de Ca^{2+} y posiblemente se debe a la activación de $\text{Ca}_v1.3_{42A}$.

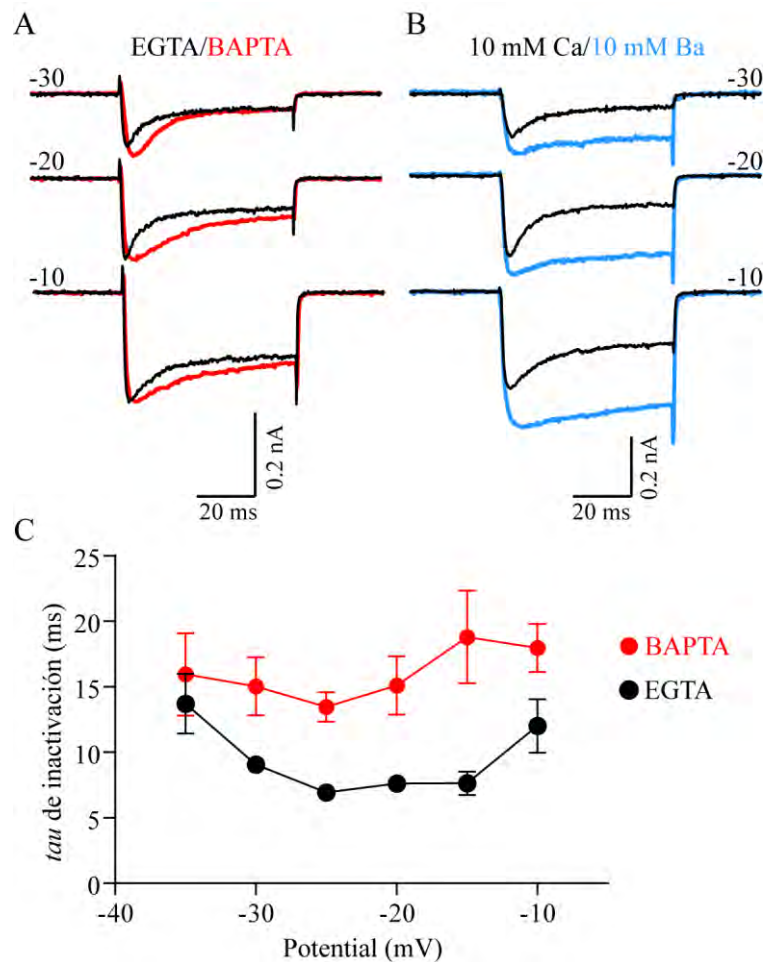


Figura 17. Inactivación dependiente de Ca^{2+} . **A)** Registros representativos de la inactivación de la ICa al sustituir EGTA (negro) por BAPTA (rojo) en la solución intracelular. **B)** Registros representativos de la ICa al sustituir Ca^{2+} (negro) por Ba^{2+} (azul) como acarreador de carga (n=4 cél). **C)** Valores de τ obtenidos de la inactivación de la ICa en función del voltaje al utilizar EGTA (n=5 cél) o BAPTA (n=8 cél; 5 WKY, 3 SHR) como agente quelante en la solución intracelular.

4. IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE $\text{Ca}_v1.3_{42A}$ POR PCR EN TIEMPO REAL.

Los resultados demuestran que la ICa transitoria presente en células cromafines de ratas WKY/SHR se debe a la activación de ICa tipo L y que la

inactivación rápida es dependiente de Ca^{2+} , sugiriendo la presencia de $Ca_V1.3_{42A}$ en las células cromafines de ratas WKY/SHR. Como ya lo mencionamos, a partir del splicing alternativo se obtienen dos variantes de $Ca_V1.3$ que se diferencian en presentar el exón 42 del carboxilo terminal de la subunidad α completo ($Ca_V1.3_{42}$) o corto ($Ca_V1.3_{42A}$) y que importantemente la variante $Ca_V1.3_{42A}$ muestra la cinética de la corriente similar a la observada en células cromafines de ratas WKY/SHR.

Para sustentar la posible presencia de la subunidad $Ca_V1.3_{42A}$ se realizó PCR en tiempo real (ver materiales y métodos) que permitió determinar y cuantificar el RNAm correspondiente a las isoformas $Ca_V1.3_{42}$ y $Ca_V1.3_{42A}$ en la médula suprarrenal de ratas WKY/SHR. Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Ricardo Félix Grijalva del CINVESTAV-IPN, con la colaboración del Dr. Ricardo González Ramírez y se utilizaron ratas Wistar con fines comparativos.

Los resultados se muestran en la figura 18. La expresión relativa de las variantes de $Ca_V1.3$ muestra que $Ca_V1.3_{42A}$ se expresa aproximadamente en la misma proporción en Wistar, WKY y SHR. Sin embargo, se carece de la variante $Ca_V1.3_{42}$ en WKY y SHR, mientras que en Wistar se expresó 15.6 veces más que $Ca_V1.3_{42A}$ (figura 18 A). En base a que el uso del exón 42 y 42A es mutuamente excluyente, se calculó la abundancia relativa tomando como 100 % la suma de $Ca_V1.3_{42}$ más $Ca_V1.3_{42A}$. Como se muestra en la figura 19 B, $Ca_V1.3_{42}$ predomina en ratas Wistar ~94%, mientras que a $Ca_V1.3_{42A}$ corresponde el 6% restante. En contraste, en WKY y SHR $Ca_V1.3_{42A}$ representa más del 99% y $Ca_V1.3_{42}$ ~ 0.1%. Por lo que en células cromafines de ratas WKY/SHR solo parece expresarse la variante $Ca_V1.3_{42A}$ de la subunidad $\alpha 1D$ ($Ca_V1.3$).

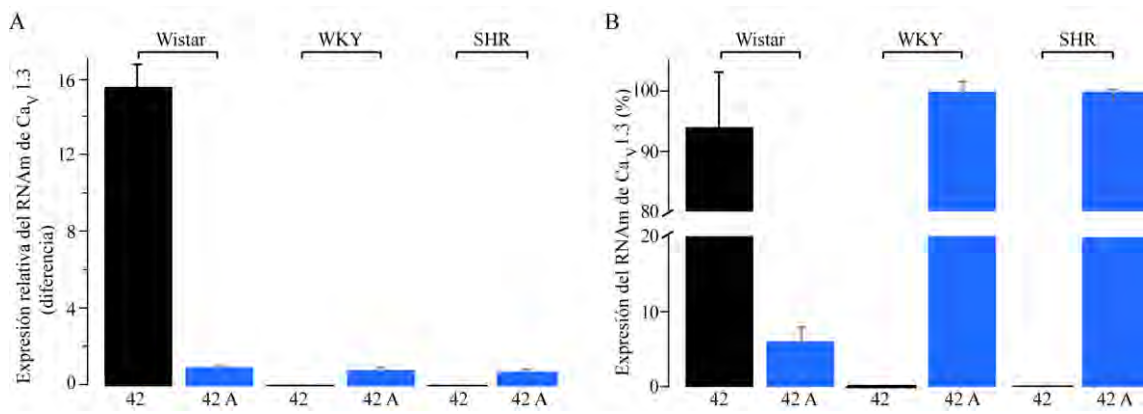


Figura 18. PCR en tiempo real de las variantes de Ca_v1.3. **A)** Expresión relativa del RNAm de las dos variantes del canal Ca_v1.3 en células cromafines de ratas Wistar, WKY y SHR, tomando como referencia la expresión de Ca_v1.3_{42A} en Wistar. **B)** Proporción de expresión de las variantes de Ca_v1.3 en células cromafines de ratas Wistar, WKY y SHR, tomando la suma de Ca_v1.3₄₂ + Ca_v1.3_{42A} como el 100 %.

5. DETERMINACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE CCDV PRESENTES EN CÉLULAS CROMAFINES DE WKY Y SHR.

Para determinar los componentes de los demás subtipos de CCDV se implementó la configuración de parche perforado, los resultados obtenidos de ratas SHR y WKY fueron similares, por lo que se agruparon y se muestran en una sola figura. Debido a que en los experimentos previos no encontramos componente de ICa tipo T en células cromafines de ratas WKY/SHR, en este experimento decidimos no aplicar fármacos dirigidos contra ICa tipo T.

Como se muestra en la figura 19, una vez que se alcanzó la amplitud máxima de la ICa se aplicó gradualmente en la perfusión diferentes bloqueadores: nifedipina 5 μ M (bloquea tipo L), ω -conotoxina 1 μ M (bloquea tipo N), ω -agatoxina 2 μ M (bloquea tipo P-Q) y Cd²⁺ 200 μ M (bloquea tipo R). En base al porcentaje de bloqueo corresponde a 40.6 \pm 5 % tipo L, 23.9 \pm 7 % tipo N, 24.0 \pm 3 % tipo P-Q y 11.3 \pm 3 % tipo R. Estos resultados sugieren que la ICa en células cromafines se compone de CCDV de alto umbral de activación y que la contribución de cada subtipo de canales de Ca²⁺ es similar a la reportada en células cromafines de otras cepas de rata o de ratón (García y cols, 2006).

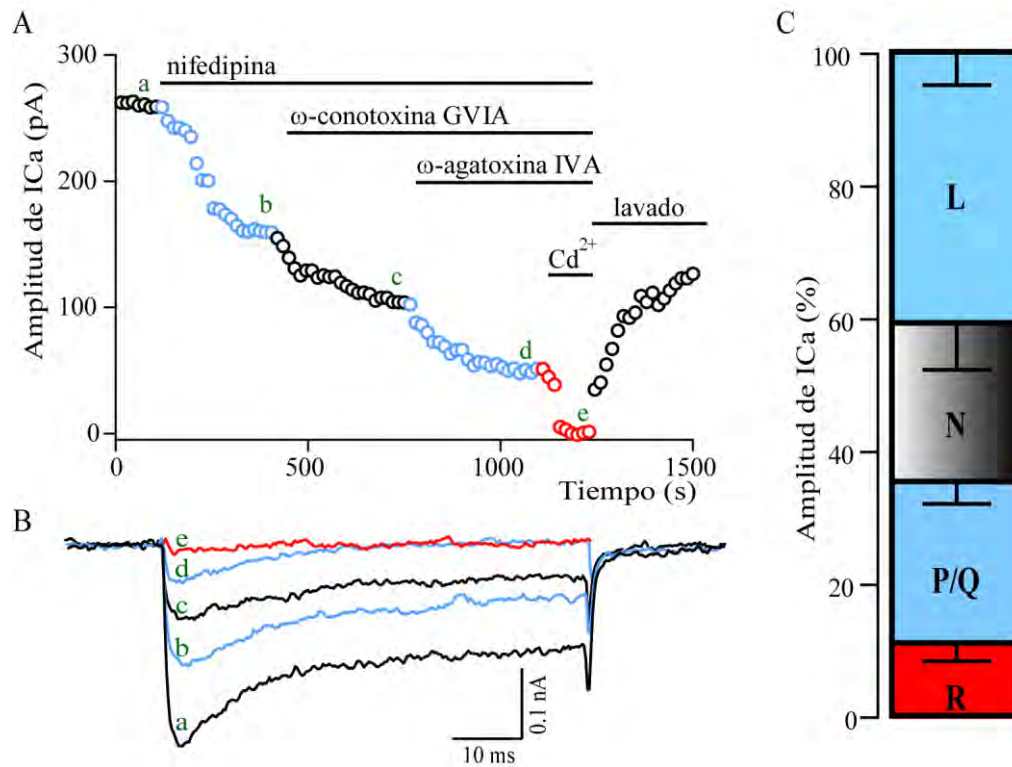


Figura 19. Subtipos de CCDV en células cromafines de rata WKY/SHR. A) Curso temporal representativo de la I_{Ca} bloqueada por los diferentes fármacos adicionados durante el tiempo indicado por las barras superiores en WKY/SHR. **B)** Registros representativos de I_{Ca} obtenidos mediante la modalidad de parche-perforado a los tiempos indicados en A; (a, control; b-e después de alcanzar el efecto máximo de los fármacos). **C)** Contribución de los diferentes subtipos de CCDV a la I_{Ca} total en células cromafines de WKY/SHR (n=4 cél).

VIII. DISCUSIÓN.

En diferentes reportes se ha sugerido que el incremento de catecolaminas circulantes puede ser un factor que precede el inicio de la hipertensión esencial en humanos y en el modelo animal de ratas SHR. El influjo de Ca^{2+} al interior celular a través de los CCDV es crucial para la liberación de catecolaminas de las células cromafines (Douglas, 1968) y como se desconocen las causas de la hipersecreción de catecolaminas de células cromafines de ratas SHR, es importante discernir cuál es la participación de los diferentes subtipos de CCDV en la ICa de éstas células. Este es el primer trabajo donde se realiza un estudio electrofisiológico de la ICa en las células cromafines de ratas hipertensas SHR y normotensas WKY en rebanadas de tejido adrenal donde se preserva la integridad del tejido y las interacciones entre las células asemejando una condición fisiológicamente óptima comparada al cultivo celular (Kajiwara y cols, 1997; Barbara y cols, 1998; de Diego y cols, 2008; Hernández y cols, 2011).

Con base en nuestros resultados podemos decir que la densidad de ICa de las células cromafines de rata SHR y WKY es muy similar. En ambas encontramos un componente transitorio que se activa e inactiva rápidamente, que predomina durante los voltajes negativos y un componente sostenido que se inactiva lentamente, a voltajes positivos predomina el componente sostenido. Ambos componentes mostraron similitud en la cinética de activación e inactivación dependiente de voltaje en ambas cepas. Adicionalmente, demostramos que en registros de ICa de células cromafines de ratas Wistar o de ratón bajo las mismas condiciones experimentales en rebanada de tejido adrenal (este trabajo; Hernández y cols, 2011) no se observó el componente transitorio de la ICa.

El tipo de corriente transitoria inactivante observado en las células cromafines de ratas SHR/WKY asemeja algunas características de la ICa tipo T (Carbone y Lux, 1984) y que ha sido reportada en células cromafines mantenidas en cultivo bajo condiciones de hipoxia crónica (Carabelli y cols, 2007; Levitsky y López-Barneo, 2009), en incubación con AMPc (Novara y cols, 2004; Giancippoli y cols, 2006) o con sobre-estimulación β adrenérgica (Novara y cols, 2004); principalmente se parecen en los valores de inactivación

dependiente de voltaje y en la cinética transitoria. En el caso de la sobre-estimulación β adrenérgica, se ha descrito que las ratas SHR presentan niveles elevados de catecolaminas circulantes, esta situación posiblemente podría sobre-estimular a los receptores β adrenérgicos (Cesetti y cols, 2003) promoviendo la re-expresión de CCDV tipo T en estas ratas.

Lo anterior nos llevó a especular que el componente transitorio observado podría corresponder a la activación de CCDV tipo T, que sería relevante fisiológicamente debido a que en ratas adultas no hay evidencias que este tipo de corriente se exprese de forma natural y cuando los canales son re-expresados, el Ca^{2+} que pasa a través de ellos, contribuye significativamente a la secreción de catecolaminas, además la excitabilidad de la célula aumentaría (Marcantoni y cols, 2008) y esto posiblemente ayudaría a explicar la hipersecreción de catecolaminas de células cromafines reportada en ratas SHR; sin embargo, la aplicación de Ni^{2+} como bloqueador de los CCDV tipo T (Lee y cols, 1999; Novara y cols, 2004; Carbone y cols, 2006; Carabelli y cols, 2007) no permitió tener una conclusión acerca de su posible participación en el componente transitorio, pues desafortunada e inesperadamente, se afectó de manera inespecífica la I_{Ca} en todos los voltajes evaluados, situación que no se observó en los trabajos de Novara y Carabelli cuando la aplicación de Ni^{2+} bloqueó específicamente la I_{Ca} tipo T en las células cromafines sin afectar los otros subtipos de corriente, quizá la diferencia sea el tipo de preparación utilizada, ellos usaron células cromafines disociadas y mantenidas en cultivo (Novara y cols, 2004; Carabelli y cols, 2007). Desafortunadamente en nuestra preparación de tejido adrenal no se obtuvo un efecto específico, probablemente el Ni^{2+} se acumuló sobre el tejido y afectó a otros subtipos de CCDV e incluso pudo afectarse la viabilidad de las células. Sin embargo, de manera importante el Ni^{2+} afectó por igual la I_{Ca} en la cepa WKY y en SHR.

Alternativamente para tener la certeza de conocer la posible presencia de CCDV tipo T en las células cromafines de ratas WKY/SHR, decidimos hacer uso de otra estrategia farmacológica; se ha reportado que el mibefradil es un fármaco que se ha utilizado como bloqueador específico de los CCDV tipo T (Martin y cols, 2000; Huang y cols, 2004); sin embargo, una vez que se incorpora a la célula es hidrolizado y se produce un metabolito activo que afecta el gating de otros subtipos de CCDV (Huang y cols, 2004), situación que

podría suceder en las células cromafines pues presentan diferentes subtipos de CCDV (Gandía y cols, 1995; García y cols, 2006). Pero en el año 2004 se obtuvo un análogo derivado de mibefradil que no produce dicho metabolito, el compuesto se denominó NNC 55-0396 y ha sido utilizado en diferentes preparaciones que expresan diferentes subtipos de CCDV, demostrando su especificidad al bloquear selectivamente la I_{Ca} tipo T (Alviña y cols, 2009; Chen y cols, 2011). En células HEK-293 que expresaron establemente las subunidades Ca_v3.2 y Ca_v3.3 demostramos que la I_{Ca} tipo T se bloqueó en su totalidad a concentración de 10 μM de NNC 55-0396; mientras que en las células cromafines de ratas SHR/WKY tal concentración no afectó la I_{Ca}, esto nos sugirió la ausencia de CCDV tipo T en éstas células. Resultados similares se han obtenido en células cromafines de rebanadas de tejido adrenal en ratón cuando se utilizó NNC 55-0396 (Hernández y cols, 2011).

Sin embargo, la divergencia en los resultados obtenidos al utilizar Ni²⁺ o NNC 55-0396 no permitió llegar a una conclusión acerca de la presencia de CCDV tipo T en nuestra preparación. Para resolver esta polémica evaluamos la desactivación de la I_{Ca} (Carbone y Lux, 1984; Matteson y Armstrong, 1986; Cribbs y cols, 1998; Kozlov y cols, 1999) y demostramos la ausencia de CCDV tipo T, los cuales se caracterizan por desactivarse lentamente (2-8 ms) entre -110 y -60 mV y nuestros resultados demostraron que la desactivación del componente transitorio fue rápida (0.2-0.3 ms) y equivalente a la observada con el componente sostenido entre -105 y -60 mV. Los valores de desactivación obtenidos fueron similares a los reportados para la I_{Ca} de alto umbral de activación (Müller y cols, 1992), es decir, no correspondieron a I_{Ca} tipo T y al mismo tiempo nos permitió proponer que el componente transitorio y el sostenido pertenecen a una misma población de CCDV, de alto umbral de activación.

Por lo tanto podemos concluir que las células cromafines de ratas SHR/WKY no presentan componente de I_{Ca} tipo T, de manera semejante a células cromafines de otros roedores en etapas adultas (García y cols, 2006, Levitsky y López-Barneo, 2009).

Aunque la densidad de I_{Ca} fue similar en SHR y WKY adicionalmente evaluamos la contribución de la I_{Ca} tipo L, pues como se ha reportado, que aunque no existe diferencia entre la I_{Ca} total en células de músculo venoso, la

proporción de ICa tipo L es mayor en las ratas SHR (62%) comparado a las WKY (42%) (Rusch y Hermsmeyer, 1998). Resultados similares se obtuvieron en otro estudio realizado por Cox y Lozinskaya en 1995, ellos demostraron que la densidad de ICa en células de músculo liso de arterias mesentéricas incrementó 47% en SHR comparado a WKY. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que las células cromafines de ratas SHR y WKY mantienen una proporción similar de ICa tipo L debido a que la aplicación de nifedipina bloqueó el mismo porcentaje de ICa en los diferentes voltajes evaluados en ambas cepas.

La parte de la ICa que no se bloqueó con nifedipina está conformada por los subtipos N, P-Q y R, pues la aplicación de ω -agatoxina y ω -conotoxina bloqueó específicamente la ICa tipo N y P-Q respectivamente. La proporción de corriente tipo R se detectó al utilizar Cd^{2+} , el cual se ha reportado que bloquea la ICa y se utiliza principalmente para disecar el componente tipo R (Zhang y cols, 1993; Albillos y cols, 2000; García y cols, 2006). Aunque no se tiene un bloqueador selectivo de la ICa tipo R, podemos ver en el trazo representativo como el componente remanente de la ICa corresponde al componente que no se eliminó al utilizar los otros bloqueadores selectivos para la ICa tipo L, N, o P-Q. Es importante aclarar que en este experimento decidimos utilizar la configuración de parche perforado para poder determinar los diferentes subtipos de CCDV presentes en las células cromafines de ratas SHR/WKY, incluyendo la ICa tipo R, pues está reportado que al no diluir el medio intracelular con esta configuración, permite que la funcionalidad de los CCDV tipo R se preserve (Albillos y cols, 2000, García y cols, 2006). Por otra parte, debido a que ya habíamos demostrado la ausencia de CCDV tipo T, en este experimento decidimos no adicionar bloqueadores de la ICa tipo T. En cuanto a las características de cinética de la ICa no observamos diferencia utilizando la modalidad de parche perforado o la de célula completa.

Con esta estrategia determinamos la contribución de los subtipos de ICa en las células cromafines de ratas SHR/WKY: 40.6 ± 5 % tipo L, 23.9 ± 7 % tipo N, 24.0 ± 3 % tipo P-Q y 11.3 ± 3 % tipo R. Estos porcentajes son semejantes a los que se han reportado para otras cepas de rata y para ratón (Gandía y cols, 1995; Hernández-Guijo y cols, 1998; Albillos y cols, 2000; García y cols, 2006;

Hernández y cols, 2011). Esto nos permite concluir que no hay diferencias en el patrón de subtipos de CCDV presentes en nuestra preparación.

La presencia del componente transitorio en estas células no se había reportado en otras cepas de ratas o roedores y como ya se mencionó no correspondió a I_{Ca} tipo T. Los datos de la cinética de activación de la I_{Ca} transitoria correlacionan con I_{Ca} que se activa a potenciales similares a I_{Ca} tipo L de bajo umbral de activación Ca_v1.3 (Xu y Lipscombe 2001; Lipscombe y cols, 2004) además cuando se evaluó la desactivación presentó valores similares a los de canales de alto umbral de activación (Müller y cols, 1992). Como se ha reportado, las células cromafines expresan CCDV tipo L Ca_v1.2 y Ca_v1.3 (García-Palomero y cols, 2000; Baldelli y cols, 2004; Benavides y cols, 2004; Marcantoni y cols, 2010). Los canales Ca_v1.2 se activan a potenciales de alrededor de -30 mV, y por la cinética de inactivación lenta podemos predecir que conforman principalmente parte del componente sostenido durante voltajes negativos, pues aproximadamente 80 % de la I_{Ca} sostenida se inhibió cuando se aplicó nifedipina. Por otra parte, las características del componente transitorio sugerían que se debía a la activación de canales Ca_v1.3, debido a que se activó la corriente aproximadamente 10 mV más negativo que el componente sostenido, además la aplicación de nifedipina disminuyó de manera significativa el componente transitorio aproximadamente 80 %. El bloqueo por nifedipina fue dependiente de voltaje, pues a voltajes negativos presentó el mayor efecto como se observó en las curvas I-V y como lo reportó Mahapatra y cols, en 2011.

En apoyo a los resultados obtenidos con nifedipina, la aplicación de un agonista específico de CCDV tipo L, Bay-K 8644 (Nowycky y cols, 1985) que aumenta su probabilidad de apertura, produjo un incremento de la amplitud de los componentes transitorio y sostenido; y de manera interesante se mantuvo la misma cinética de inactivación del componente transitorio. De manera concordante con el efecto de nifedipina, la amplitud de la I_{Ca} al utilizar Bay-K 8644 se amplificó en el mismo rango de voltajes. Estos resultados fueron una prueba robusta de que el componente transitorio se debe a la activación de CCDV tipo L.

En 2008 Singh y colaboradores demostraron que existen dos variantes obtenidas por splicing alternativo del canal Ca_v1.3, una con el carboxilo

terminal del exón 42 completo denominada $Ca_v1.3_{42}$ y otra con el carboxilo terminal del exón 42 corto denominada $Ca_v1.3_{42A}$. Interesantemente con estas dos variantes, lograron demostrar la importancia del carboxilo terminal en la modulación de la dependencia del Ca^{2+} para la inactivación del canal; la ICa tipo L se caracteriza por inactivarse de manera dependiente de Ca^{2+} ya sea de manera rápida o lenta (Xu y Lipscombe, 2001). Los resultados de Singh demostraron que la variante $Ca_v1.3_{42A}$ que presenta mayor velocidad de inactivación dependiente del Ca^{2+} y permite que la ICa se active 5 mV antes que la variante $Ca_v1.3_{42}$. Con base en esto investigamos la inactivación dependiente de Ca^{2+} en nuestro modelo, nuestros resultados muestran que los tiempos del ajuste de la inactivación disminuyeron cuando se utilizó BAPTA, lo que apunta a que el Ca^{2+} que entra es rápidamente atrapado por el BAPTA y permite que la inactivación dependiente de Ca^{2+} se comporte más lenta. En cambio, con EGTA que atrapa más lentamente el Ca^{2+} , promueve que el Ca^{2+} que entró permanezca mayor tiempo libre aumentando la velocidad de inactivación del canal (Tsien, 1980).

Con base en estos resultados determinamos que la inactivación de la ICa en células cromafines de ratas WKY/SHR es dependiente de Ca^{2+} , proponiendo que se debe a la activación de $Ca_v1.3_{42A}$. Esto se corroboró al utilizar Ba^{2+} en lugar de Ca^{2+} en la solución extracelular, esta es una estrategia que permitió demostrar que la inactivación es dependiente de Ca^{2+} , pues aunque los CCDV permiten el paso de iones Ba^{2+} , éste no induce que se active el complejo Ca^{2+} -calmodulina que es el que genera la inactivación observada con Ca^{2+} . Como se demostró, al hacer dicha maniobra la inactivación se eliminó convirtiéndose en una corriente sostenida, de tal manera que resultó imposible realizar un ajuste exponencial y quedó demostrado que la inactivación es dependiente de Ca^{2+} . Adicionalmente incrementó la amplitud de la corriente y como dato sobresaliente es que al abatir la inactivación los trazos de corriente asemejan la ICa observada en las células cromafines de ratas Wistar. Por otro lado, esta maniobra apoyó los resultados previos sobre la ausencia de CCDV tipo T, pues está claro que los CCDV tipo T también dejan pasar Ba^{2+} a través de su poro, sin embargo en este subtipo de CCDV la inactivación no es dependiente de Ca^{2+} es dependiente de voltaje (Carbone y Lux 1984; Matteson y Armstrong, 1986).

Estos resultados sobre el análisis de la inactivación dependiente de Ca^{2+} apoyaron la conjetura de la presencia de la subunidad $\text{Ca}_V1.3_{42A}$ en las células cromafines de ratas SHR/WKY.

El análisis electrofisiológico nos permitió determinar que no existen diferencias en la ICa de células cromafines de ratas SHR y WKY que puedan explicar la diferencia en la secreción de catecolaminas reportada. No se presentó componente de ICa tipo T; pues el componente transitorio se debe a la activación de ICa tipo L, la cual representa aproximadamente el 45 % del total de la ICa. De manera similar a como se ha reportado en células cromafines de otros roedores, coexiste una proporción similar a la reportada de CCDV tipo N, P-Q y R. Asimismo, nuestros resultados sugieren que predomina la ICa tipo L acarreada por el canal $\text{Ca}_V1.3_{42A}$ debido a su cinética de activación y a su pronunciada inactivación dependiente de Ca^{2+} .

En general se considera que solo en las células cromafines y en células ciliadas internas de la cóclea se da la proporción de ICa acarreada por $\text{Ca}_V1.2$ de 20 % y por $\text{Ca}_V1.3$ el 80 %, pues en neuronas del sistema nervioso central y en otras células neuroendocrinas se ha reportado que la proporción es a la inversa 80 % $\text{Ca}_V1.2$ y 20 % $\text{Ca}_V1.3$ (Calin-Jageman y Lee, 2008); por esta razón, si predominantemente se presenta $\text{Ca}_V1.3$ como ICa tipo L, el expresar la variante de inactivación rápida en WKY/SHR, contrario a lo observado en Wistar, debería tener implicaciones en la cantidad de Ca^{2+} que entra a la célula.

En vista de la posible existencia de $\text{Ca}_V1.3_{42A}$ en las células cromafines de ratas SHR/WKY, exploramos mediante PCR en tiempo real, la cuantificación del RNAm que codifica para las dos variantes de dicha subunidad. Como se pudo observar, la cuantificación de RNAm correspondiente a la versión de carboxilo terminal corto $\text{Ca}_V1.3_{42A}$ es semejante entre las ratas Wistar, SHR/WKY; sin embargo de manera interesante, la subunidad con el carboxilo terminal completo $\text{Ca}_V1.3_{42}$ se encuentra presente solo en las ratas Wistar y 15.6 veces más abundante que la subunidad $\text{Ca}_V1.3_{42A}$. Estos resultados demuestran que en las células cromafines de las ratas SHR/WKY el componente transitorio de la ICa se debe al reclutamiento de canales $\text{Ca}_V1.3_{42A}$, y que la subunidad $\text{Ca}_V1.3_{42}$ no se expresa, contrasta importantemente con lo demostrado en células cromafines de ratas Wistar. Además la deficiencia en la expresión de la subunidad no inactivante $\text{Ca}_V1.3_{42}$

promueve que se distinga claramente la I_{Ca} acarreada a través de Ca_v1.3_{42A} y por lo tanto predomine el componente inactivante transitorio en la I_{Ca} de células cromafines de ratas SHR/WKY. Mientras que en células cromafines de ratas Wistar la presencia de la subunidad no inactivante predomina sobre la subunidad inactivante, por lo cual una vez que la I_{Ca} se activa alcanza su amplitud máxima y se mantiene de manera sostenida o se inactiva muy lentamente durante el pulso de prueba.

A pesar de no encontrar diferencias en la I_{Ca} de células cromafines de ratas SHR y WKY, es importante entender las consecuencias fisiológicas de expresar la subunidad Ca_v1.3_{42A} en éstas ratas y dilucidar si este patrón de expresión solo sucede en la médula suprarrenal o si sucede en otros tejidos de estas ratas. Sería importante demostrar si este patrón de expresión podría ayudar a explicar las diferencias conductuales de hiperactividad, ansiedad o la susceptibilidad a desarrollar alteraciones fisiológicas que conlleven a enfermedades como la hipertensión esencial.

Se ha reportado que los CCDV Ca_v1.3 contribuyen importantemente a la corriente marcapaso que promueve el inicio de potenciales de acción en células cromafines de ratón (Marcantoni y cols, 2010, Vandael y cols, 2010) en el nodo sinusal (Mangoni y cols, 2003) y en diferentes tipos neuronales (Putzier y cols, 2009).

En células cromafines los Ca_v1.3 se encuentran finamente acoplados a los canales BK, más que los Ca_v1.2 (Marcantoni y cols, 2010; Vandael y cols, 2010) además controlan a los SK debido a que se activan cerca del potencial de membrana (Vandael y cols, 2010). La interacción entre estos tipos de canales permite controlar corrientes sub-umbrales que pueden dirigir el disparo de potenciales de acción. Sin embargo, de manera general la subunidad predominante en dichas células es la variante Ca_v1.3₄₂, que se caracteriza por presentar inactivación dependiente de Ca²⁺ lenta (Singh y cols, 2008), pues el carboxilo terminal completo del exón 42 es un sitio que no solo modula el gating promoviendo que se active 5-10 mV más positivo, sino que previene la inactivación rápida dependiente de Ca²⁺ (Koschak y cols, 2001; Xu y Lipscombe, 2001). Dichas características permiten que Ca_v1.3 funcione como un canal marcapaso y debido a su inactivación lenta, en células cromafines promueve señales intracelulares de Ca²⁺ más duraderas repercutiendo en la

liberación de catecolaminas (Marcantoni y cols, 2010). Situación que puede estar modificada en células cromafines de ratas WKY/SHR.

Discordantemente como se observó en nuestros resultados, las ratas SHR/WKY presentan la subunidad $Ca_v1.3$ con carboxilo terminal corto del exón 42, con inactivación dependiente de Ca^{2+} rápida, lo cual puede contribuir a la entrada de Ca^{2+} a voltajes más negativos comparado al canal $Ca_v1.3_{42}$ o incluso al $Ca_v1.2$ y aunque puede considerarse que también participan como marcapaso debido a que su umbral de activación se mantiene cerca del potencial de membrana, probablemente debido a su rápida inactivación podría limitar la entrada de Ca^{2+} durante los potenciales de acción generando señales intracelulares de Ca^{2+} menos duraderas respecto a las generadas por $Ca_v1.3_{42}$, ausentes en las células cromafines de ratas SHR/WKY; además, no parece haber una compensación de la inactivación de la ICa por otro subtipo de canal.

Se considera que los CCDV tipo L son muy importantes para el funcionamiento de las células cromafines y el control de la secreción durante su estimulación, asimismo, de los diferentes subtipos de CCDV en las células cromafines, los tipo L se consideran de los más importantes debido a su gran porcentaje de expresión (~50%) ya sea en las células cromafines de rata, ratón e incluso en humanos (Gandía y cols, 1995; García y cols, 2006; Mahapatra y cols, 2010). Se ha determinado que los $Ca_v1.2$ contribuyen principalmente a la entrada de Ca^{2+} durante la fase de subida del potencial de acción y se considera que mantiene la señalización intracelular de Ca^{2+} durante despolarizaciones repetitivas (García y cols, 2006; Mahapatra y cols, 2011) y no contribuyen a la corriente marcapaso; mientras que los $Ca_v1.3$ se consideran más importantes para la generación de corriente marcapaso (Marcantoni y cols, 2010).

La participación e importancia de los $Ca_v1.3$ en la excitabilidad de células cromafines se ha determinado mediante el uso de ratones knockout (deficientes del canal $Ca_v1.3$) logrando determinar que su ausencia reduce la ICa que dirige el disparo de potenciales de acción, es decir disminuye la corriente marcapaso; adicionalmente reduce más del 50 % el porcentaje de células que muestran potenciales de acción espontáneos (Marcantoni y cols, 2010; Vandael y cols, 2010; Mahapatra y cols, 2011). Aunque controversialmente, en otro estudio con ratones knockout de $Ca_v1.3$ llevado a

cabo por el grupo de Pérez-Álvarez en 2010, se sugiere que $Ca_v1.2$ es quien dirige la actividad marcapaso en células cromafines de ratón, debido a que muestran mayor inactivación dependiente de Ca^{2+} que $Ca_v1.3$.

Comparando esta situación con lo que ocurre en miocitos cardiacos del nodo sinusal, donde la subunidad $Ca_v1.3$ de inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} controla las corrientes marcapaso (Zhang y cols, 1993; Mangoni y cols, 2003), podríamos inferir que en las células cromafines de ratas SHR/WKY la variante $Ca_v1.3_{42A}$ que muestra inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} sea la responsable de las corrientes que promueve el disparo de potenciales de acción espontáneos en estas cepas, probablemente en las células de ratas Wistar donde prevalece la subunidad $Ca_v1.3$ de inactivación dependiente de Ca^{2+} lenta haya menor corriente marcapaso que promueva una menor generación de potenciales de acción. Sin embargo, estas especulaciones solo podrían resolverse mediante el análisis de potenciales de acción espontáneos por fijación de corriente de la técnica de patch-clamp, ocupando éste modelo de ratas, que solo muestran el componente inactivante rápido, comparándolo con ratas Wistar.

Por otra parte, la ausencia de la subunidad $Ca_v1.3$ en los ratones transgénicos no muestra diferencia en la secreción estimulada de catecolaminas comparada con el ratón silvestre, lo que sugiere que dicha subunidad no es necesaria para la movilización de los gránulos de secreción hacia la membrana (Marcantoni y cols, 2010). En contraparte, Pérez-Álvarez sugiere que la subunidad $Ca_v1.3$ de inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} es la subunidad que regula la mayor entrada de Ca^{2+} durante el potencial de acción y por lo tanto controla la secreción de catecolaminas a voltajes negativos.

El modelo de ratas SHR/WKY debido a sus características de presentar la subunidad $Ca_v1.3$ de inactivación rápida dependiente de Ca^{2+} y que carece de la subunidad $Ca_v1.3$ de inactivación lenta podría ayudar a resolver estas controversias acerca de la participación del canal en la secreción de catecolaminas, y tomando en cuenta que la inactivación rápida de la corriente de Ca^{2+} se puede prevenir al utilizar Ba^{2+} en la solución extracelular, se podría esperar que bajo esta situación se emule lo que sucede en las células cromafines de las ratas Wistar donde predomina la expresión de $Ca_v1.3$ de

inactivación lenta. Esta propuesta podría resolverse mediante la aplicación de la técnica de amperometría con microelectrodos de fibra de carbono, la cual permite evaluar la secreción de catecolaminas en tiempo real (Wightman y cols, 1991) utilizando la preparación de rebanadas de tejido adrenal para que los resultados obtenidos puedan tener mayor implicación fisiológica.

Consideramos que el modelo de ratas SHR/WKY podría, de alguna manera, considerarse como el modelo del ratón knockout del canal $Ca_v1.3$ debido a las siguientes razones: en el ratón silvestre y en la rata Wistar $Ca_v1.3_{42}$ representa la forma más abundante, mientras que en SHR/WKY $Ca_v1.3_{42}$ es deficiente; la proporción de la variante $Ca_v1.3_{42A}$ se inactiva rápidamente y funcionalmente no se puede sustituir por la variante $Ca_v1.3_{42}$ debido a su ausencia; y por último, la expresión nula de la subunidad de inactivación lenta $Ca_v1.3_{42}$ aparentemente no es compensada por otra subunidad que mantenga la ICa de manera sostenida, pues en todos los casos registrados siempre se presentó inactivación de la ICa rápida.

Aparentemente la deficiencia del $Ca_v1.3$ no parece ser letal, al menos esto se ha reportado en ratones knockout heterocigotos, mientras que en ratones knockout homocigotos se han reportado alteraciones como bradicardia y discapacidad auditiva. Si podemos extrapolar lo que sucede en el ratón hacia el humano, el modelo predice que en pacientes heterocigotos no habría síntomas clínicos aparentes, pero en pacientes homocigotos podría expresarse como discapacidad auditiva y disfunción cardíaca (Striessnig y cols, 2010). Podría resultar interesante realizar estudios de capacidad auditiva en las ratas WKY/SHR y en contraparte, valoraciones de la presión arterial en los ratones knockout carentes de $Ca_v1.3$ con la finalidad de demostrar los posibles efectos de la deficiencia de este canal de manera homocigota o heterocigota en la presión arterial.

La consecuencia fisiológica de la solitaria expresión de $Ca_v1.3_{42A}$ en células cromafines de ratas SHR/WKY aún queda por esclarecerse. Lo que es evidente, es que la ICa en ambas cepas es similar, por lo que se puede considerar que el Ca^{2+} que entra por los CCDV no parece estar afectado en las células cromafines de ratas SHR en las fases tempranas de la hipertensión.

Es probable que otros mecanismos puedan explicar la hipersecreción de catecolaminas reportada en células cromafines de ratas SHR, como puede ser

hiperestimulación de los receptores de ACh, mayor expresión de receptores de ACh, mayor contenido de catecolaminas en los gránulos de secreción, alteraciones en otros tipos de canales iónicos, modificaciones en el manejo del Ca^{2+} intracelular por parte de los reservorios intracelulares, e incluso anomalías a nivel de la maquinaria exocitótica que promueve la fusión de los gránulos con la membrana celular, por mencionar algunos.

IX. CONCLUSIONES.

Con base en nuestros resultados obtenidos en células cromafines de rebanadas de glándula suprarrenal de ratas hipertensas SHR y normotensas WKY concluimos lo siguiente:

Se demostró la presencia de un componente transitorio que se activó e inactivó rápidamente y un componente sostenido de la ICa, ambos presentaron similitud en la densidad de corriente y en la cinética de activación e inactivación dependiente de voltaje entre ambas cepas.

La ICa tipo T no participa en la ICa total de células cromafines de ratas WKY y SHR.

La proporción de los subtipos de CCDV fue similar entre ratas WKY y SHR; y semejante a la de otros roedores 40.6 ± 5 % tipo L, 23.9 ± 7 % tipo N, 24.0 ± 3 % tipo P-Q y 11.3 ± 3 % tipo R.

Las células cromafines de ratas WKY y SHR carecen de la variante $Ca_v1.3_{42}$ y solo expresan la variante $Ca_v1.3_{42A}$ de la subunidad $\alpha 1D$.

El componente transitorio se debe al reclutamiento de canales $Ca_v1.3_{42A}$ que se manifiesta al no estar presente la variante $Ca_v1.3_{42}$.

El componente transitorio no se observó en células cromafines de ratas Wistar, pues predomina la expresión de la variante $Ca_v1.3_{42}$.

No existe diferencia significativa en la densidad de ICa entre células cromafines de ratas WKY y SHR que pueda explicar la hipersecreción de catecolaminas en etapas tempranas de la hipertensión.

X. BIBLIOGRAFÍA.

Albillos A, Neher E, and Moser T. R-Type Ca^{2+} channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J Neurosci* 20: 8323-8330, 2000.

Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, García AG, García-Sancho J, Montero M, and Álvarez J. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144: 241-254, 1999.

Alviña K, Ellis-Davies G, and Khodakhah K. T-type calcium channels mediate rebound firing in intact deep cerebellar neurons. *Neuroscience* 158: 635-641, 2009.

Antonaccio MJ and Kerwin L. Pre- and postjunctional inhibition of vascular sympathetic function by captopril in SHR. Implication of vascular angiotensin II in hypertension and antihypertensive actions of captopril. *Hypertension* 3: 154-62, 1981.

Baldelli P, Hernández-Guijo JM, Carabelli V, Novara M, Cesetti T, Andres-Mateos E, Montiel C, and Carbone E. Direct and remote modulation of L-channels in chromaffin cells: distinct actions on alpha1C and alpha1D subunits? *Mol Neurobiol* 29: 73-96, 2004.

Artelejo A R. Electrical Properties of Adrenal Chromaffin Cells. Capítulo 12 en: "*The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells*". Scherübl H y Hescheler J Editores. CRC press. 1995.

Barbara JG, Poncer JC, McKinney RA, and Takeda K. An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J Neurosci Methods* 80: 181-189, 1998.

Benavides A, Calvo S, Tornero D, Gonzalez-García C, and Ceña V. Adrenal medulla calcium channel population is not conserved in bovine chromaffin cells in culture. *Neuroscience* 128: 99-109, 2004.

Borkowski KR and Quinn P. The effect of bilateral adrenal demedullation on vascular reactivity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 80: 429-437, 1983.

Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, and Shimahara T. Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* 537: 35-44, 2001.

Calin-Jageman I and Lee A. Ca_v1 L-type Ca^{2+} channel signaling complexes in neurons. *J Neurochem* 105: 573-583, 2008.

- Carabelli V, Giaccipoli A, Baldelli P, Carbone E, and Artalejo AR. Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys J* 85: 1326-1337, 2003.
- Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, and Carbone E. Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca^{2+} -dependence. *Eur Biophys J* 36: 753-762, 2007.
- Carbone E, Giaccipoli A, Marcantoni A, Guido D, and Carabelli V. A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium* 40: 147-154, 2006.
- Carbone E and Lux HD. A low voltage-activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophys J* 46: 413-418, 1984.
- Carbone E, Marcantoni A, Giaccipoli A, Guido D, and Carabelli V. T-type channels-secretion coupling: evidence for a fast low-threshold exocytosis. *Pflugers Arch* 453: 373-383, 2006.
- Cassis LA, Stitzel RE, and Head RJ. Hypernoradrenergic innervation of the caudal artery of the spontaneously hypertensive rat: an influence upon neuroeffector mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 234: 792-803, 1985.
- Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555, 2000.
- Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1-23, 2011.
- Ceña V, Nicolas GP, Sánchez-García P, Kirpekar SM, and García AG. Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience* 10: 1455-1462, 1983.
- Cesetti T, Hernández-Guijo JM, Baldelli P, Carabelli V, and Carbone E. Opposite action of beta1- and beta2-adrenergic receptors on Ca_v1 L-channel current in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 23: 73-83, 2003.
- Coupland RE. The natural history of the chromaffin cell: twenty-five years on the beginning. *Arch Histol Cytol* 52 Suppl: 331-341, 1989.
- Coupland RE, Pyper AS, and Hopwood D. A method for differentiating between noradrenaline and adrenaline storing cells in the light and electron microscope. *Nature* 201: 1240-1242, 1964.
- Cowley AW, Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nat Rev Genet* 7: 829-840, 2006.

Cox RH and Lozinskaya IM. Augmented calcium currents in mesenteric artery branches of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 26: 1060-1064, 1995.

Cribbs LL, Gómora JC, Daud AN, Lee JH, and Pérez-Reyes E. Molecular cloning and functional expression of Ca(v)3.1 T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett* 466: 54-58, 2000.

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, and Pérez-Reyes E. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83: 103-109, 1998.

Cryer PE, Santiago JV, and Shah S. Measurement of norepinephrine and epinephrine in small volumes of human plasma by a single isotope derivative method: response to the upright posture. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 1025-1029, 1974.

Chan SA, Polo-Parada L, and Smith C. Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices. *Arch Biochem Biophys* 435: 65-73, 2005.

Chan SA and Smith C. Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 537: 871-885, 2001.

Chen CC, Fan YP, Shin HS, and Su CK. Basal sympathetic activity generated in neonatal mouse brainstem-spinal cord preparation requires T-type calcium channel subunit 1H. *Exp Physiol* 96: 486-494.

de Champlain, L Farley, D Cousineau and M R van Ameringen. Circulating catecholamine levels in human and experimental hypertension. *Circ Res*. 38:109-114, 1976.

de Diego AM, Gandáa L, and García AG. A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 287-301, 2008.

Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Álvarez-Arguelles H, and Borges R. Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 145-163, 2008.

Dornas WC and Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* 36: 731-737. 2011

Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34: 451-474, 1968.

Douglas WW and Poisner AM. On the mode of action of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion: increased uptake of calcium during the secretory response. *J Physiol* 162: 385-392, 1962.

Douglas WW and Rubin RP. Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature* 192: 1087-1089, 1961a.

Douglas WW and Rubin RP. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol* 159: 40-57, 1961b.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, México. 80-81, 2006.

Fenwick EM, Marty A, and Neher E. A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol* 331: 577-597, 1982.

Fox AP, Nowycky MC, and Tsien RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* 394: 149-172, 1987.

Gandía L, Borges R, Albillos A, and García AG. Multiple calcium channel subtypes in isolated rat chromaffin cells. *Pflugers Arch* 430: 55-63, 1995.

García-Palomero E, Cuchillo-Ibanez I, García AG, Renart J, Albillos A, and Montiel C. Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca²⁺ channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett* 481: 235-239, 2000.

García AG, García-De-Diego AM, Gandía L, Borges R, and García-Sancho J. Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* 86: 1093-1131, 2006.

Genuth SM. The endocrine system. Section VIII en: *Physiology*. Berne R, Levy M, Koeppen B, Stanton B. 5th edition. Mosby. St. Louis, Missouri, USA. 2004.

Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, and Carabelli V. Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited Ca_v3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J* 90: 1830-1841, 2006.

Goldstein DS, Horwitz D, Keiser HR, Polinsky RJ, and Kopin IJ. Plasma l-[³H]norepinephrine, d-[¹⁴C]norepinephrine, and d,l-[³H]isoproterenol kinetics in essential hypertension. *J Clin Invest* 72: 1748-1758, 1983.

Grassi G, Cattaneo BM, Seravalle G, Lanfranchi A, and Mancia G. Baroreflex control of sympathetic nerve activity in essential and secondary hypertension. *Hypertension* 31: 68-72, 1998.

Grimaldo Avilés J I. Glándula Suprarrenal. Capítulo VIII en: *Fisiología: células, órganos y sistemas*. Muñoz Martínez E J, García X. Ediciones Científicas Universitarias, México 1997.

Grobecker G, Roizen MF, Weise V, Saavedra JM, and Kopin IJ. Letter: Sympathoadrenal medullary activity in young, spontaneously hypertensive rats. *Nature* 258: 267-268, 1975.

Guyton AC y Hall JE. Tratado de Fisiología Médica. 11 ed. Traducido de la 12 ed. en inglés. Barcelona, España, 2011.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, and Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100, 1981.

Hauger RL and Dautzenberg FM. Regulation of the stress response by corticotrophin-releasing factor receptors. Part III en: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn PM and Freeman ME. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. 2000.

Head RJ. Hypertensive innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat. *Blood Vessels* 26: 1-20, 1989.

Hendley ED. WKHA rats with genetic hyperactivity and hyperreactivity to stress: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 24: 41-44, 2000.

Hernández-Guijo JM, de Pascual R, García AG, and Gandía L. Separation of calcium channel current components in mouse chromaffin cells superfused with low- and high-barium solutions. *Pflugers Arch* 436: 75-82, 1998.

Hernández A, Segura-Chama P, Jiménez N, García AG, Hernández-Guijo JM, and Hernández-Cruz A. Modulation by endogenously released ATP and opioids of chromaffin cell calcium channels in mouse adrenal slices. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C610-623, 2011.

Hill JC, Herbst K, and Sanabria F. Characterizing operant hyperactivity in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Behav Brain Funct* 8: 5. 2012.

Hillarp NA and Hokfelt B. Evidence of adrenaline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells. *Acta Physiol Scand* 30: 55-68, 1953.

Hoffman BB and Taylor P. Neurotransmission. Section II en: *Goodman's and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th ed. Hardman JG, Limbird LE, and Goodman Gilman A. McGraw-Hill, New York, USA. 2001.

- Hollins B and Ikeda SR. Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J Neurophysiol* 76: 1195-1211, 1996.
- Horrigan FT and Bookman RJ. Releasable pools and the kinetics of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Neuron* 13: 1119-1129, 1994.
- Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, Zhuang H, Zhang M, Ragsdale DS, and Li M. NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropane-carboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 193-199, 2004.
- Kajiwara R, Sand O, Kidokoro Y, Barish ME, and Iijima T. Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol* 47: 449-464, 1997.
- Kaplan NM. Endocrine Hypertension. Section 4 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th edition. Wilson J D & Foster D W. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1992.
- Kataoka Y, Majane EA, and Yang HY. Release of NPY-like immunoreactive material from primary cultures of chromaffin cells prepared from bovine adrenal medulla. *Neuropharmacology* 24: 693-695, 1985.
- Kidokoro Y, Miyazaki S, and Ozawa S. Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J Physiol* 324: 203-220, 1982.
- Kidokoro Y and Ritchie AK. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol* 307: 199-216, 1980.
- Kim SJ, Lim W, and Kim J. Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells. *Brain Res* 675: 289-296, 1995.
- Koschak A, Reimer D, Huber I, Grabner M, Glossmann H, Engel J, and Striessnig J. α 1D ($Ca_v1.3$) subunits can form L-type Ca^{2+} channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 276: 22100-22106, 2001.
- Kozlov AS, McKenna F, Lee JH, Cribbs LL, Pérez-Reyes E, Feltz A, and Lambert RC. Distinct kinetics of cloned T-type Ca^{2+} channels lead to differential Ca^{2+} entry and frequency-dependence during mock action potentials. *Eur J Neurosci* 11: 4149-4158, 1999.

Laflamme A, Oster L, Cardinal R, and de Champlain J. Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 30: 278-287, 1997.

Landsberg L, Young J B. Catecholamines and the adrenal medulla. Section 4 en: *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th edition. Wilson J D & Foster D W. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1992.

Lee JH, Gómora JC, Cribbs LL, and Pérez-Reyes E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys J* 77: 3034-3042, 1999.

Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, Tsoporis J, and Coughlin M. Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 69: 714-721, 1991.

Lee RM, Triggle CR, Cheung DW, and Coughlin MD. Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 10: 328-338, 1987.

Levitsky KL and López-Barneo J. Developmental change of T-type Ca^{2+} channel expression and its role in rat chromaffin cell responsiveness to acute hypoxia. *J Physiol* 587: 1917-1929, 2009.

Lim DY, Jang SJ, and Park DG. Comparison of catecholamine release in the isolated adrenal glands of SHR and WKY rats. *Auton Autacoid Pharmacol* 22: 225-232, 2002.

Lipscombe D, Helton TD, and Xu W. L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol* 92: 2633-2641, 2004.

Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. Dec 25(4):402-408, 2001.

López MG, Shukla R, García AG, and Wakade AR. A dihydropyridine-resistant component in the rat adrenal secretory response to splanchnic nerve stimulation. *J Neurochem* 58: 2139-2144, 1992.

Louis WJ and Howes LG. Genealogy of the spontaneously hypertensive rat and Wistar-Kyoto rat strains: implications for studies of inherited hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 7: S1-5, 1990.

- Mahapatra S, Marcantoni A, Vandael DH, Striessnig J, and Carbone E. Are Ca_v1.3 pacemaker channels in chromaffin cells? Possible bias from resting cell conditions and DHP blockers usage. *Channels (Austin)* 5: 219-224, 2011.
- Mangoni ME, Couette B, Bourinet E, Platzer J, Reimer D, Striessnig J, and Nargeot J. Functional role of L-type Cav1.3 Ca²⁺ channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5543-5548, 2003.
- Marcantoni A, Carabelli V, Comunanza V, Hoddah H, and Carbone E. Calcium channels in chromaffin cells: focus on L and T types. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 233-246, 2008.
- Marcantoni A, Vandael DH, Mahapatra S, Carabelli V, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, and Carbone E. Loss of Ca_v1.3 channels reveals the critical role of L-type and BK channel coupling in pacemaking mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 30: 491-504, 2010.
- Martin RL, Lee JH, Cribbs LL, Pérez-Reyes E, and Hanck DA. Mibefradil block of cloned T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 302-308, 2000.
- Matteson DR and Armstrong CM. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol* 87: 161-182, 1986.
- Mintz IM and Bean BP. Block of calcium channels in rat neurons by synthetic omega-Aga-IVA. *Neuropharmacology* 32: 1161-1169, 1993.
- Mintz IM, Venema VJ, Swiderek KM, Lee TD, Bean BP, and Adams ME. P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* 355: 827-829, 1992.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A, and García AG. Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 231-240, 2009.
- Miranda-Ferreira R, de Pascual R, de Diego AM, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A, and García AG. Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 685-693, 2008.
- Müller TH, Misgeld U, and Swandulla D. Ionic currents in cultured rat hypothalamic neurones. *J Physiol* 450: 341-362, 1992.

North RA and Egan TM. Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. *Br Med Bull* 39: 71-75, 1983.

Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Giancippoli A, and Carbone E. Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca_v3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol* 558: 433-449, 2004.

Nowycky MC, Fox AP, and Tsien RW. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316: 440-443, 1985.

O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, and Burgoyne RD. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentration in single bovine adrenal chromaffin cells from video imaging of fura-2. *EMBO J* 8: 401-411, 1989.

Pak CH. Plasma adrenaline and noradrenaline concentrations of the spontaneously hypertensive rat. *Jpn Heart J* 22: 987-995, 1981.

Pérez-Álvarez A, Hernández-Vivanco A, Caba-Gonzalez JC, and Albillos A. Different roles attributed to Ca_v1 channel subtypes in spontaneous action potential firing and fine tuning of exocytosis in mouse chromaffin cells. *J Neurochem* 116: 105-121, 2010.

Perlman RL and Chalfie M. Catecholamine release from the adrenal medulla. *Clin Endocrinol Metab* 6: 551-576, 1977.

Pinterova M, Kunes J, and Zicha J. Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol Res* 60: 381-402, 2011.

Putzier I, Kullmann PH, Horn JP, and Levitan ES. $Ca_v1.3$ channel voltage dependence, not Ca^{2+} selectivity, drives pacemaker activity and amplifies bursts in nigral dopamine neurons. *J Neurosci* 29: 15414-15419, 2009.

Rae J, Cooper K, Gates P, and Watsky M. Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J Neurosci Methods* 37: 15-26, 1991.

Rusch NJ and Hermsmeyer K. Calcium currents are altered in the vascular muscle cell membrane of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 63: 997-1002, 1988.

Schegel W, Mollard P. Electrical activity and stimulus-secretion coupling in neuroendocrine cells. Chapter 3 en: "The electrophysiology of Neuroendocrine cells". Scherubl H y Hescheler J. Editores, CRC press, 1995.

Singh A, Gebhart M, Fritsch R, Sinnegger-Brauns MJ, Poggiani C, Hoda JC, Engel J, Romanin C, Striessnig J, and Koschak A. Modulation of voltage-and Ca^{2+} -dependent

gating of Ca_v1.3 L-type calcium channels by alternative splicing of a C-terminal regulatory domain. *J Biol Chem* 283: 20733-20744, 2008.

Striessnig J, Bolz HJ, and Koschak A. Channelopathies in Ca_v1.1, Ca_v1.3, and Ca_v1.4 voltage-gated L-type Ca²⁺ channels. *Pflugers Arch* 460: 361-374, 2010.

TerBush DR, Bittner MA, and Holz RW. Ca²⁺ influx causes rapid translocation of protein kinase C to membranes. Studies of the effects of secretagogues in adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 263: 18873-18879, 1988.

Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* 19: 2396-2404, 1980.

Tung LH, Rand MJ, and Majewski H. Adrenaline-induced hypertension in rats. *Clin Sci (Lond)* 61 Suppl 7: 191s-193s, 1981.

Vandael DH, Marcantoni A, Mahapatra S, Caro A, Ruth P, Zuccotti A, Knipper M, and Carbone E. Ca_v1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing. *Mol Neurobiol* 42: 185-198, 2010.

Verdugo D L. Médula suprarrenal. Capítulo 50 en: *Fisiología Médica*. Drucker C R. Editorial El Manual Moderno, México 2005.

Villalobos C, Nuñez L, Montero M, García AG, Alonso MT, Chamero P, Álvarez J, and García-Sancho J. Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organelle during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* 16: 343-353, 2002.

Viveros OH, Diliberto EJ, Jr., Hazum E, and Chang KJ. Opiate-like materials in the adrenal medulla: evidence for storage and secretion with catecholamines. *Mol Pharmacol* 16: 1101-1108, 1979.

Weiss JL. Ca²⁺ signaling mechanisms in bovine adrenal chromaffin cells. *Adv Exp Med Biol* 740: 859-872, 2012.

Westfall T and Westfall D. Adrenergic agonists and antagonists en: *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Brunton L, Lazo J and Parker K, McGraw-Hill, New York. USA. 237-295, 2007.

Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Jr., and Viveros OH. Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10754-10758, 1991.

Will CC, Aird F, and Redei EE. Selectively bred Wistar-Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Mol Psychiatry* 8: 925-932, 2003.

Winkler H and Westhead E. The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 5: 1803-1823, 1980.

Xu W and Lipscombe D. Neuronal $Ca_v1.3$ $\alpha(1)$ L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci* 21: 5944-5951, 2001.

Yaari Y, Hamon B, and Lux HD. Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235: 680-682, 1987.

Yamakage M and Namiki A. Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review. *Can J Anaesth* 49: 151-164, 2002.

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, and Tsien RW. Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32: 1075-1088, 1993.

Zhou Z and Neher E. Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch* 425: 511-517, 1993.

Zuber SM, Kantorovich V, and Pacak K. Hypertension in pheochromocytoma: characteristics and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40: 295-311, 2011.