



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS EN LAS  
CÉLULAS CROMAFINES DE RATAS SHR PREHIPERTENSAS E  
HIPERTENSAS CON SUS CONTRAPARTES RATAS WKY NORMOTENSAS

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

**PRESENTA:**

QBC. JOHANNA GUADALUPE PEÑA DEL CASTILLO

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**COMITÉ TUTOR**

DR. FREDY ROBERTO CIFUENTES NAVARRO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DRA. CITLALI TRUETA SEGOVIA  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2022.



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Arturo Hernández Cruz por el apoyo, enseñanzas y guía durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Pedro Segura Chama por su guía, sugerencias, paciencia e instruirme en la técnica de amperometría utilizada en este estudio.

Al Dr. Nicolás Jiménez Pérez por su apoyo e instrucciones técnicas brindadas durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia por su apoyo, guía, sugerencias a este estudio y su apoyo técnico en el uso del microscopio confocal.

A la Dra. Claudia Rivera Cerecedo directora del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus valiosas observaciones y sugerencias a mi trabajo:

Dra. Citlali Trueta Segovia (Instituto Nacional de Psiquiatría)

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

A los revisores de esta tesis y miembros del jurado: Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dra. María Castañeda Bueno, Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz y la Dra. Gertrudis Hortensia por sus valiosas sugerencias y observaciones que le dieron a este trabajo, y que ayudaron a mejorarlo.

A mis compañeros de laboratorio: Daniel, Pedro, Tzitzí, Nicolás por sus contribuciones y experiencias compartidas.

A Claudia, Ruth y Andrea que me apoyaron en todo momento, por sus charlas y consejos, muchas gracias.

A mi mamá, hermanos y esposo por su apoyo y amor.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biomédicas, a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Fisiología Celular por las facilidades otorgadas para realizar este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número de becario 306030.

A los proyectos que apoyaron este trabajo: DGAPA-PAPIIT AG200119, CONACYT 315803 y 314839, y al Ministerio de Ciencia e Innovación con el proyecto PID2020-114824GB-100.



## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1. El sistema nervioso .....	7
1.1. El sistema nervioso autónomo .....	7
2. El sistema simpatoadrenal y la presión arterial.....	10
3. La hipertensión arterial.....	10
4. El modelo de la rata espontáneamente hipertensa (SHR).....	12
5. La glándula suprarrenal .....	13
5.1. Las células cromafines adrenales.....	13
6. Generalidades de las catecolaminas .....	14
6.1. Síntesis de catecolaminas .....	14
6.2. Secreción de catecolaminas .....	15
6.3. Exocitosis .....	17
6.4. Señales de calcio en células cromafines .....	20
<b>II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>23</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO .....</b>	<b>28</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>V. OBJETIVO.....</b>	<b>29</b>
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>29</b>
<b>VII. METODOLOGÍA.....</b>	<b>30</b>

1. Animales .....	30
2. Monitoreo de la presión arterial.....	30
3. Cultivo de células cromafines .....	31
4. Técnica de amperometría .....	32
5. Señales de calcio intracelular .....	36
6. Microscopía electrónica de transmisión .....	37
7. Análisis de datos y estadística .....	38
<b>VIII. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
1. Comparación de la presión arterial en ratas SHR y WKY. ....	39
2. Secreción basal de catecolaminas en CCs de ratas SHR prehipertensas y WKY de la misma edad. ....	40
3. Secreción basal de catecolaminas en CCs de ratas SHR hipertensas y WKY de la misma edad. ....	42
4. Secreción de catecolaminas luego de una despolarización con K <sup>+</sup> 60 mM en CCs de ratas SHR prehipertensas y WKY de la misma edad.....	47
5. Secreción de catecolaminas tras una despolarización con K <sup>+</sup> 60 mM en las CCs de las ratas SHR hipertensas y WKY de la misma edad. ....	53
6. Secreción de catecolaminas luego de la estimulación con cafeína en CCs de SHR prehipertensas y WKY de la misma edad.....	59
7. Contribución de los receptores de rianodina en la liberación de catecolaminas en las CCs de ratas SHR prehipertensas y WKY de la misma edad. ....	64
8. Señales de Ca <sup>2+</sup> intracelular en CCs de SHR prehipertensas, SHR hipertensas y su correspondiente grupo control de CCs de WKY de la misma edad. ....	69
9. Gránulos de secreción en CCs de ratas SHR prehipertensas y SHR hipertensas comparadas con su control normotenso WKY de la misma edad .....	73
<b>IX. DISCUSIÓN .....</b>	<b>78</b>

X. CONCLUSIONES .....	85
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	86
XII. APÉNDICE .....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup>
AAAD	Aromatic L- amino acid decarboxylase (Descarboxilasa de L- aminoácidos aromáticos)
ACh	Acetilcolina
AD	Adrenalina
ATP	Adenosina de trifosfato
CA	Catecolaminas
CCDV	Canales de Calcio dependientes de Voltaje
CCs	Células Cromafines
CICR	Calcium-induced-Ca <sup>2+</sup> release, (Liberación de Ca <sup>2+</sup> inducida por Ca <sup>2+</sup> )
DA	Dopamina
DBH	Dopamina- β-hidroxilasa
DHEA	Deshidroepiandrosterona
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato o IP <sub>3</sub>
IRP	Immediately Releasable Pool, Poza de liberación inmediata
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
NA	Noradrenalina
pA	Picoamperios
pC	Picocoulomb

PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase, Feniletolamina N Metiltransferasa
RAS	Sistema renina-angiotensina
RE	Retículo endoplásmico
RRP	Readily Releasable Pool (Poza de Vesículas Listas para ser Liberadas)
RVP	Reserve Vesicle Pool (Poza de Vesículas de Reserva)
Ry	Rianodina
RyR	Receptores de Rianodina
SHR	Spontaneous Hypertensive Rat (Ratas Espontáneamente Hipertensas)
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (Receptor del Factor de Anclaje de la Proteína de Fijación Sensible a N-etilmaleimida soluble)
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNPS	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Simpático
TH	Tirosina Hidroxilasa
WKY	Wistar Kyoto Rats, Ratas Wistar Kioto

## RESUMEN

La hipertensión esencial es una patología de causas desconocidas, sin embargo, existen factores que se han asociado con su desarrollo —por ejemplo, alteraciones en el sistema simpatoadrenal e incremento en los niveles de catecolaminas circulantes— tanto en pacientes hipertensos como en las ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

El incremento en la liberación de catecolaminas en células cromafines (CCs) —de ratas SHR— se ha asociado a una mayor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios intracelulares y la amplificación de la señal por medio del mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ; este incremento también ha sido reportado en SHR desde edades prehipertensivas.

Por lo anterior, este trabajo se enfoca en evaluar la liberación de catecolaminas tanto de manera espontánea como estimulada, las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, así como el tamaño y densidad de los gránulos de secreción glandular en las células cromafines de la médula suprarrenal de ratas SHR prehipertensas (SHRpre) de 4 a 5 semanas de edad y Wistar Kyoto (WKY) de la misma edad.

La liberación de catecolaminas se estudió por medio de la técnica de amperometría en CCs en cultivo de SHRpre y WKY. Tras la despolarización con  $\text{K}^+$ , la carga acumulada fue ~2.9 veces mayor en las CCs de SHRpre en comparación con WKY. Es interesante notar que, en la mitad de las CCs de SHRpre, la carga acumulada tras la estimulación con  $\text{K}^+$  fue indistinguible de las CCs de WKY; mientras que en el 29% CCs de SHRpre, la carga acumulada fue ~3 veces mayor y el resto fue ~6 veces mayor en comparación con las CCs de WKY y en las SHR hipertensas (SHRhip) —de 12 semanas— fue ~2.8 veces mayor en las CCs de WKY. La carga y la amplitud promedio por espiga fueron también mayores en CCs de SHRpre y SHRhip en comparación con CCs de WKY de la misma edad.

Al estimular las CCs de SHRpre y WKY con cafeína, la carga acumulada fue ~2 veces mayor en SHRpre. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fueron ~1.5 mayores tras ser despolarizadas con un pulso de  $\text{K}^+$  y de ~1.4 veces mayor al estimular con cafeína en CCs de SHRpre. Después de la incubación con rianodina, la carga acumulada se redujo un 57% en CCs de SHRpre en comparación con un 14% en las CCs de WKY, lo que sugiere una mayor contribución de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la secreción de catecolaminas en las SHRpre; el tamaño de los gránulos de secreción podría explicar el aumento en la secreción de las mismas. Sin embargo: (i) nuestros resultados no mostraron diferencia en el diámetro de los gránulos de CCs de SHRpre o SHRhip en comparación con CCs de WKY de la misma edad; y (ii) las CCs de SHRpre y SHRhip tienen una mayor cantidad de gránulos en comparación con las CCs de WKY, lo cual podría explicar parcialmente el incremento en la secreción.

Los resultados de este estudio ayudan a comprender las alteraciones presentes en ratas SHRpre y la contribución del sistema simpatoadrenal en las etapas iniciales de la hipertensión arterial esencial.

## ABSTRACT

Essential hypertension is a pathology of unknown causes; however, several factors have been associated with its development, such as alterations in the sympathoadrenal system and increased levels of circulating catecholamines, both in hypertensive patients and in spontaneously hypertensive rats (SHR). Increased catecholamine release in chromaffin cells (CCs) of SHR rats has been associated with increased  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular pools and signal amplification via the  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanism. Increased intracellular pool  $\text{Ca}^{2+}$  release has also been reported in SHR at prehypertensive ages. Therefore, this work focused on evaluating both spontaneous and stimulated catecholamine release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals, as well as the size and density of secretory granules in adrenal medullary chromaffin cells of 4- to 5-week-old prehypertensive SHR (SHRpre) and age-matched Wistar Kyoto (WKY) rats.

Catecholamine release was studied by amperometry in CCs cultured from SHRpre and WKY. After depolarization with  $\text{K}^+$ , the cumulative charge was ~2.9-fold higher in SHRpre CCs compared with WKY. Interestingly, in half of SHRpre CCs, cumulative charge after stimulation with  $\text{K}^+$  was indistinguishable from WKY CCs, whereas in 29% SHRpre CCs cumulative charge was ~3-fold higher, and the remainder was ~6-fold higher compared to WKY CCs. While in 12-week hypertensive SHRs (SHRhip) it was ~2.8-fold greater in WKY CCs. Average charge and amplitude per spike were also greater in CCs from SHRpre and SHRhip compared to age-matched WKY CCs.

Upon stimulation in SHRpre and WKY CCs with caffeine, the cumulative charge was ~2-fold higher in SHRpre. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals were ~1.5-fold higher after being depolarized with a pulse of  $\text{K}^+$  and ~1.4-fold higher upon stimulation with caffeine in SHRpre CCs. After incubation with ryanodine, the cumulative charge was reduced by 57% in SHRpre CCs compared to 14% in WKY CCs, suggesting a more significant contribution of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release to catecholamine secretion in



SHRpre. The size of secretory granules could explain the increase in catecholamine secretion. However: (i) our results showed no difference in granule diameter from SHRpre or SHRhip CCs compared with age-matched WKY CCs; and (ii) SHRpre and SHRhip CCs have a larger number of granules compared to WKY CCs, which could partially explain the increased secretion.

These results help to understand the alterations present in SHRpre rats and the contribution of the sympathoadrenal system in the early stages of essential hypertension.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. El sistema nervioso

El sistema nervioso —formado por el cerebro, la médula espinal y los nervios periféricos— es una estructura altamente especializada y compleja que procesa información para regular todas las funciones fisiológicas del organismo (Michael-Titus et al., 2014; Snell, 2007), conformado por dos partes: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP), ambos separados anatómicamente pero funcionalmente interconectados.

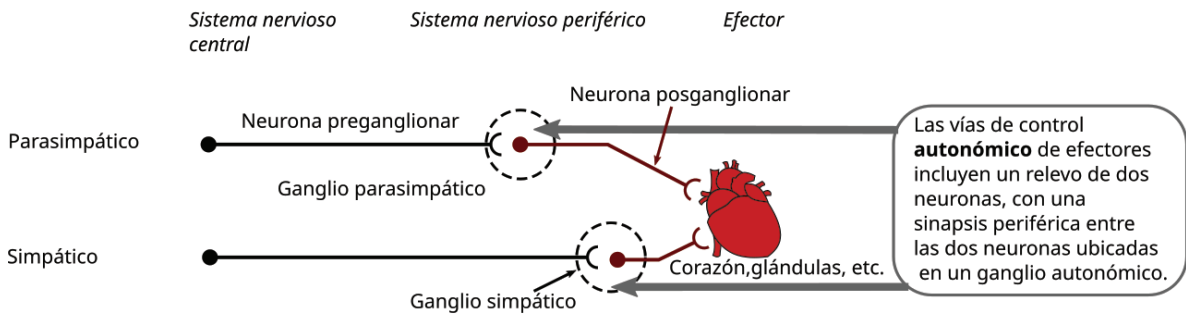
El SNP está constituido por fibras nerviosas que transmiten información sensorial y motora específica al SNC, estas se dividen en aferentes (o sensoriales), las cuales transmiten información de la periferia al SNC y fibras eferentes (o motoras), que se encargan de transmitir la respuesta del SNC a la periferia. El SNC está formado por la médula espinal, el tronco encefálico y el cerebro.(Fernández, 2015). A su vez, el SNP se divide en sistema nervioso somático y sistema nervioso autónomo (SNA). El sistema nervioso somático, se encarga de inervar el musculo esquelético e interviene en las funciones controladas voluntariamente. Por su parte el SNA, regula diferentes funciones corporales involuntarias e inerva órganos como el corazón, el musculo liso y las glándulas (Michael-Titus et al., 2014).

### 1.1. El sistema nervioso autónomo

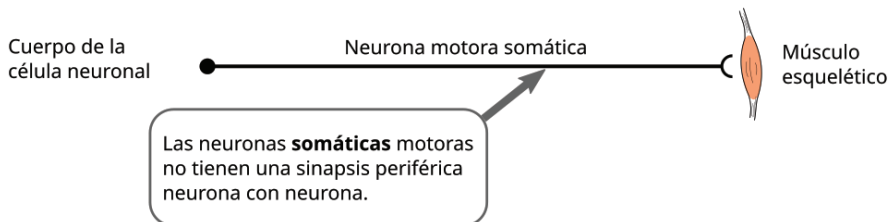
El sistema nervioso autónomo (SNA) está dividido en simpático y parasimpático y se encarga de controlar la mayoría de las funciones viscerales en el cuerpo; es regulado por el sistema nervioso central (SNC) en centros localizados en la médula espinal, el tronco cerebral y el hipotálamo; a su vez inerva el músculo liso, el corazón y las glándulas secretoras (Crossman y Neary, 2015; Hill y Wyse, 2006).

El sistema nervioso simpático (SNS) se activa, principalmente, durante situaciones de estrés, emergencia o actividad física. Por otra parte, el sistema nervioso parasimpático (SNPS) domina durante los procesos vinculados con la captación y almacenamiento de energía, como la alimentación, digestión y absorción (Guyton y Hall, 2010; Lüllmann, Mohr, y Hein, 2010). Generalmente, el SNS y SNPS producen efectos opuestos y la interacción entre ambos sistemas es una adaptación constante para equilibrar las actividades en el organismo. Cada uno de estos sistemas consta de neuronas preganglionares, que transmiten los estímulos desde el SNC al ganglio, y neuronas posganglionares, que transmiten los estímulos desde el ganglio al órgano blanco (Figura 1).

**a) Sistema nervioso autónomo**



**b) Sistema nervioso somático**



**Figura 1.** Organización de los sistemas nerviosos autónomo y somático de los mamíferos, con ejemplos de órganos efectores. Modificada de Hill y Wyse, 2006.

Los cuerpos celulares de las neuronas preganglionares —del SNS— cuyo neurotransmisor es la acetilcolina (ACh) se sitúan en la asta intermediolateral de la sustancia gris de la medula espinal, desde el primer segmento torácico o dorsal hasta el segundo o tercer segmento lumbar; razón por la cual se denomina también toracolumbar. A su vez, éstas hacen sinapsis con los ganglios paravertebrales,

situados a ambos lados de la columna vertebral, en los ganglios prevertebrales (celíaco, mesentérico superior e inferior y aortorrenal) y unas pocas en los ganglios terminales próximos al órgano efector. Después las neuronas postganglionares, cuyo principal neurotransmisor es la noradrenalina (NA), salen de estos ganglios e inervan glándulas, órganos y tejidos.

Contrario a lo anterior, la médula de la glándula suprarrenal recibe fibras preganglionares procedentes del nervio esplácnico y se comporta como una neurona posganglionar que, al ser estimulada, libera catecolaminas. (Fernández, 2015; Hill y Wyse 2006). Por su parte, el principal neurotransmisor en las neuronas preganglionares parasimpáticas también es la Ach. Estas neuronas se encuentran en varios núcleos de los nervios craneales en el tronco encefálico, así como en la región intermedia de los segmentos S3 y S4 de la medula espinal sacra. Las neuronas postganglionares proyectan directamente hacia sus órganos blanco y su neurotransmisor es la ACh (Gibbins, 2013; Guyton y Hall, 2010).

Durante situaciones de estrés o peligro, el SNS y la médula de la glándula suprarrenal actúa para reaccionar adecuadamente; este conjunto anatómico-fisiológico es denominado sistema simpatoadrenal (Wilson et al., 1992). El SNS actúa liberando noradrenalina, que estimula al corazón y produce un aumento de la frecuencia y fuerza de contracción del mismo, la contracción de los vasos sanguíneos, dilatación de las pupilas, entre otros efectos (Guyton y Hall, 2010). Asimismo, la médula de la glándula suprarrenal —al ser estimulada por su innervación simpática— libera grandes cantidades de adrenalina (alrededor del 80%) y noradrenalina en menor cantidad (alrededor de 20%) al torrente sanguíneo, provocando casi los mismos efectos que la estimulación directa por terminaciones simpáticas, pero con un efecto prolongado ya que la eliminación de noradrenalina (NA) y adrenalina (AD) del torrente sanguíneo es más lenta (2-4 minutos), mientras que la recaptación de noradrenalina en la hendidura sináptica —liberada directamente en el órgano blanco—, ocurre en segundos. De manera que el SNS y la médula adrenal actúan en conjunto, permitiendo la estimulación a los órganos por dos vías, potenciando la respuesta. Además, la médula suprarrenal puede estimular

órganos que son indirectamente inervados por nervios simpáticos (Guyton y Hall, 2010).

## **2. El sistema simpatoadrenal y la presión arterial**

La presión arterial está determinada por dos factores: la propulsión de sangre por el corazón y la resistencia del flujo sanguíneo a través de los vasos. La estimulación nerviosa simpática —junto con la noradrenalina y adrenalina circulante en el torrente sanguíneo— incrementa ambos parámetros, produciendo un aumento de la presión arterial (Guyton y Hall, 2010).

El sistema simpatoadrenal se activa durante situaciones de ejercicio físico, estrés o peligro, teniendo —entre otros efectos—, un aumento de la presión arterial. Se han asociado alteraciones del sistema simpatoadrenal con el desarrollo y mantenimiento de hipertensión arterial tanto en humanos como en modelos animales (Currie et al., 2012; Fisher y Paton, 2012; Goldstein, 1983; Mancia y Grassi, 2014).

## **3. La hipertensión arterial**

La presión sanguínea es la fuerza que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos, ésta actúa tanto en las arterias como en las venas; sin embargo, en el uso clínico, el término siempre se refiere a la presión en las arterias. El nivel de presión arterial depende del gasto cardíaco, la resistencia periférica y el volumen sanguíneo; si el corazón bombea sangre a la aorta durante la contracción ventricular (sístole), la presión ahí se eleva hasta alrededor de 120 mm Hg en reposo, este es el valor de la presión arterial sistólica. El valor de la presión arterial diastólica —de unos 80 mm Hg— se produce cuando el corazón se relaja entre latidos y la presión en la aorta desciende (Huch y Engelhardt, 2011). Por lo mencionado anteriormente, la presión arterial se expresa por sus valores de presión sistólica/diastólica: registros de presión arterial por debajo de  $\leq 90/50$  mm Hg se considera como hipotensión, mientras que valores  $\geq 140/90$  mm Hg es considerado como hipertensión (Guyton y Hall, 2010).

La hipertensión arterial es una enfermedad crónica y en México se encuentra entre las nueve principales causas de muerte. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (Ensanut MC, 2016) la prevalencia de hipertensión arterial en adultos fue de 25.5 % (25.1% en mujeres y 24.9% en hombres), de los cuales 40% desconocían padecerla (Campos-Nonato et al., 2018). Su desarrollo en las personas tiene diversas causas: factores genéticos, mala alimentación, edad avanzada, vida sedentaria, tabaquismo y otras enfermedades crónicas, como la obesidad y diabetes (Campos-Nonato et al., 2018).

Esta afección, se clasifica en función de si se conoce o no su génesis. La hipertensión esencial/primaria es aquella donde la causa es desconocida y no tiene causas secundarias definidas, aunque se han asociado algunos factores genéticos el sistema simpatoadrenal, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y el manejo de sodio por el riñón (Grassi et al., 2008; Laflamme et al., 1997; Singh et al., 2010).

Por otro lado, la hipertensión secundaria sí tiene causas reconocibles (como enfermedad renovascular, insuficiencia renal, feocromocitoma, aldosteronismo, etcétera) La hipertensión esencial representa el 95% de todos los casos activos (Carretero y Oparil, 2000).

En este trabajo nos interesó estudiar la participación del sistema simpatoadrenal en el desarrollo temprano de la hipertensión. Existen varios reportes en humanos y en el modelo animal de estudio de hipertensión esencial —rata espontáneamente hipertensa, SHR -, (de Champlain et al., 1976; Goldstein, 1983; Pak, 1981), donde se ha demostrado una hiperactividad del sistema simpatoadrenal, incluso en etapas prehipertensivas (Li et al., 2012). Este hallazgo sugiere que la hiperactividad del SNA podría ser un marcador temprano de esta afección.

Por lo cual, esta investigación se enfoca en el estudio de la contribución del sistema simpatoadrenal en etapas prehipertensas, específicamente de la médula

de la glándula suprarrenal; donde se encuentran las células cromafines, encargadas de la liberación de noradrenalina y adrenalina a la circulación. Los resultados mostrados en este trabajo son relevantes para mejorar la comprensión de los mecanismos que se encargan de establecer la hipertensión esencial, lo cual podría ayudar a identificar blancos moleculares para el desarrollo de mejores estrategias farmacológicas.

#### **4. El modelo de la rata espontáneamente hipertensa (SHR)**

El modelo de la rata espontáneamente hipertensa —por sus siglas en inglés SHR (Spontaneous Hypertensive Rat)—, fue desarrollada en 1963 en la Universidad de Kyoto, Japón, por Okamoto & Aoki, quienes encontraron una rata Wistar macho con presión arterial sistólica de 145-175 mm Hg. Ésta fue cruzada con una rata Wistar hembra —con una presión arterial sistólica de 130-140 mm Hg— y al obtener crías de este cruzamiento —después de reproducciones endogámicas entre las crías— se obtuvieron ratas con una presión arterial sistólica uniformemente elevada (>180 mm Hg) (Anón, 1976; Okamoto y Aoki, 1963).

El 100% de las ratas SHR presentan presión alta a las 15 semanas de edad, además tienen características similares a las que ocurren en el humano con hipertensión esencial (componente genético). El mecanismo del desarrollo de la enfermedad no es conocido y el curso temporal de la enfermedad es similar al que ocurre en el humano, pero con un tiempo reducido a 2 años. Además, las ratas SHR desarrollan complicaciones cardiovasculares —hipertrofia ventricular, insuficiencia cardíaca, derrame hemorrágico cerebral, nefroesclerosis, necrosis fibrinoide en arterias pequeñas y arteriolas—. El consumo de sal acelera el desarrollo de hipertensión; y por otro lado, la administración de medicamentos antihipertensivos reduce la presión arterial y la aparición de complicaciones en las SHR (Anón, 1976; Dornas y Silva, 2011; Louis y Howes, 1990). Como cepa control, de estas ratas, se suele usar la Wistar Kyoto (WKY), endogámica de las ratas Wistar, de la cual se derivó la cepa de SHR (Anón, 1976).

## 5. La glándula suprarrenal

Las glándulas suprarrenales se encuentran localizadas encima de cada uno de los riñones, cada una de ellas formada por dos partes: la corteza y la médula adrenal. La corteza se encarga de secretar hormonas esteroideas y está formada por tres capas que producen diferentes hormonas esteroideas —a partir del precursor colesterol—, dependiendo de la enzima específica encontrada en cada zona. La zona glomerular (capa más externa) secreta mineralocorticoides como aldosterona; la zona fascicular (capa media) produce glucocorticoides como cortisol y corticosterona; y la zona reticular (capa más interna) secreta andrógenos como deshidroepiandrosterona (DHEA) (Dutt, Wehrle, y Jialal, 2022; Guyton y Hall, 2010).

Por otro lado, en la médula de la glándula suprarrenal, se encuentran las células cromafines encargadas de secretar catecolaminas, tales como la noradrenalina y adrenalina —al torrente sanguíneo— las cuales actúan como hormonas y neurotransmisores (Paravati, Rosani, y Warrington, 2022).

### 5.1. Las células cromafines adrenales

En la médula de la glándula suprarrenal se encuentran las células cromafines —del griego *chroma* (color) y del latín *affinis* (afín)—, nombre que proviene de su afinidad para teñirse con sales de cromo (Coupland et al. 1964); (CCs) son de forma irregular y se organizan en grupos pequeños rodeados por vasos sanguíneos, fibras nerviosas y tejido conectivo (Huber, Kalcheim, y Unsicker, 2009; Perlman y Chalfie, 1977).

Las CCs provienen de la cresta neural —de dónde también proceden las neuronas del sistema nervioso autónomo— y pueden considerarse neuronas simpáticas postganglionares modificadas, que no inervan directamente un órgano blanco, sino que liberan catecolaminas (CA) al torrente sanguíneo al ser estimuladas por el SNS (Díaz-Flores et al., 2007; Wilson, 1992). Las CCs se clasifican dependiendo de la CA que sintetizan —almacenan y secretan—: las



células adrenérgicas, las cuales equivalen a alrededor del 80-85% y el resto son noradrenérgicas (Coupland et al., 1964; Eränkö 1955). La diferencia bioquímica es la presencia de la enzima feniletolamina N metil transferasa —PNMT, por sus siglas en inglés— en las células adrenérgicas, la cual convierte la noradrenalina en adrenalina mediante la transferencia de un grupo metilo (a partir de la S-adenosil metionina) al grupo amino terminal de la noradrenalina (Coupland et al., 1964; Perlman y Chalfie, 1977).

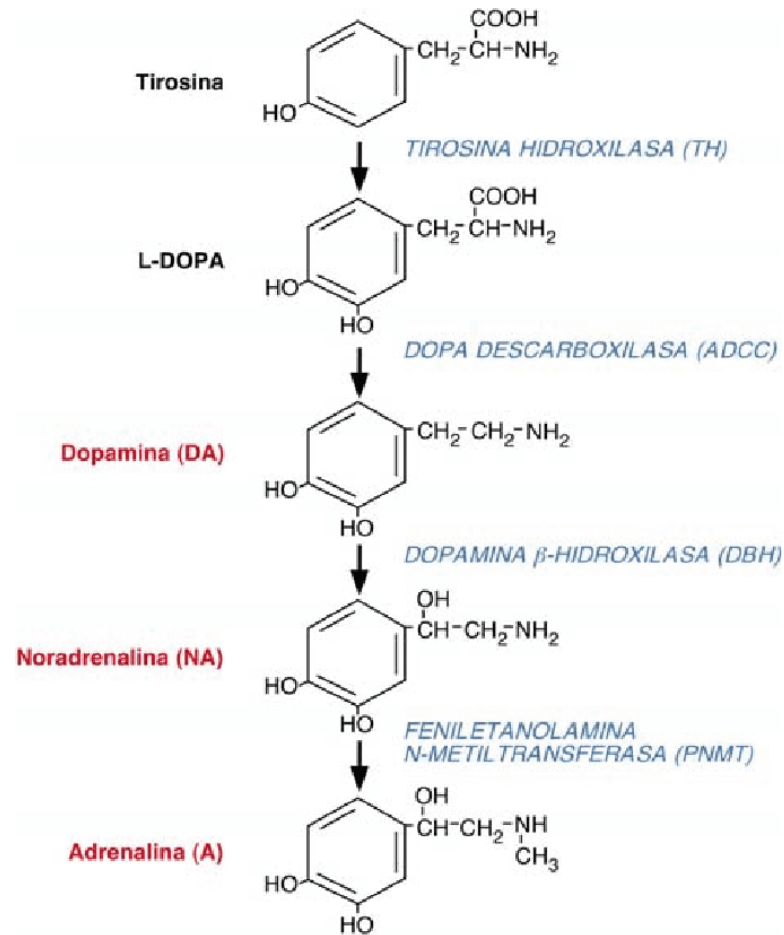
Las CA de las células cromafines se encuentran almacenadas en gránulos —también llamadas vesículas grandes de núcleo denso—, que se ven en el citoplasma con un microscopio electrónico, después de ser fijadas con glutaraldehído/tetróxido de osmio (Douglas, 1968). Los gránulos están caracterizados por tener un núcleo electrodenso y, dependiendo de la CA que contengan, presentan un núcleo de mayor o menor densidad, además de ser de diferente tamaño. Los gránulos de adrenalina tienen un diámetro de 50 a 350 nm con un núcleo de moderada densidad, mientras que los gránulos que contienen noradrenalina son más grandes: de 185 a 495 nm de diámetro y presentan núcleos con mayor densidad (Díaz-Flores et al., 2007).

## **6. Generalidades de las catecolaminas**

### **6.1. Síntesis de catecolaminas**

Las CA son sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina, el cual proviene de la dieta y de la hidroxilación del aminoácido fenilalanina en el hígado. En el citoplasma de las CCs, la L-tirosina es convertida por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y es convertida en Dopamina (DA) por la enzima descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AAAD), cuya actividad es dependiente del cofactor piridoxal fosfato. Una vez que la DA se sintetiza, es captada por los gránulos de secreción, donde es convertida en noradrenalina (NA) por la enzima dopamina-  $\beta$ -hidroxilasa (DBH). A su vez, la NA es, transformada en adrenalina (ADR) por la enzima Feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT, por sus siglas en inglés: phenylethanolamine N-methyltransferase) (Figura 2), la cual

se encuentra principalmente en el citoplasma de las CCs que producen adrenalina (Kvetnansky et al., 2009).



**Figura 2.** Ruta de la síntesis de catecolaminas. Tomada de Sánchez-Camacho, 2018.

## 6.2. Secreción de catecolaminas

Los experimentos realizados por Douglas y Rubin en 1961 —en glándulas adrenales de gato—, reportan que el neurotransmisor acetilcolina (ACh) es el principal estímulo para la secreción de CA por las CCs. Al realizar experimentos donde las glándulas eran perfundidas —en un medio sin calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), y para después ser estimuladas con ACh —, dieron como resultado que las CCs no liberaran CA. Además, encontraron que al cambiar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución de perfusión, se observaba cambios grandes en la cantidad de CA

secretadas, con lo cual concluyeron que el proceso de liberación de CA es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Douglas y Rubin, 1961b, 1961a). A la secreción de neurotransmisores y hormonas, —dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ — se le denominó “acoplamiento estímulo-secreción” (Douglas, 1968), donde el  $\text{Ca}^{2+}$  es el agente intermediario entre los dos procesos.

El proceso de secreción de CA —por las CCs — comienza con la liberación de acetilcolina (ACh) por las terminales simpáticas preganglionares provenientes del nervio esplácnico. La ACh actúa sobre receptores nicotínicos y/o muscarínicos que se encuentran en la membrana de las CCs. Esta secreción se debe, mayoritariamente, a la acción de los receptores nicotínicos formados por varias subunidades que conforman un canal iónico, que se abre cuando la ACh se une a una de las subunidades; estos permiten la entrada de sodio ( $\text{Na}^+$ ) a la célula y en menor medida  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo así la despolarización de la membrana, la cual, en reposo, se encuentra entre -50 y -60 mV y puede alcanzar valores de +30 mV durante un potencial de acción (Calvo-Gallardo et al., 2016; Wallace, Chen, y Marley, 2002).

El potencial de acción generado activa los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV). Consecuentemente fluye  $\text{Ca}^{2+}$  hacia interior de la célula, aumentando así la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). A su vez, el incremento dispara el proceso de exocitosis de CA mediante la fusión gránulos de secreción (Kvetnansky et al., 2009; Nassar-Gentina et al., 1988). La siguiente fase del potencial de acción es la repolarización de la membrana mediante la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  y la activación de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje. Durante esta fase, el  $\text{Ca}^{2+}$  continúa fluyendo a través de los CCDV, activando la corriente tipo BK, de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . La hiperpolarización que ocurre al final resulta de la activación de corrientes de  $\text{K}^+$  sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  (BK y SK) (Scherubl y Hescheler, 1995).

### 6.3. Exocitosis

El proceso mediante el cual las vesículas liberan su contenido hacia el exterior se denomina exocitosis y se han descrito dos variantes: constitutiva y regulada (Kelly, 1985). La exocitosis constitutiva —que ocurre de manera continua en todas las células— principalmente está enfocada en la liberación de moléculas que formarán parte de la membrana celular o matriz extracelular (Padawer, 1998). Por otro lado, la exocitosis regulada se desencadena milisegundos después de la despolarización de la membrana y se produce en las células excitables, como son neuronas y células endocrinas; no es constante y se encuentra restringida en tiempo y espacio. Para poder llevarse a cabo es necesaria una maquinaria especializada que permita que tras un estímulo, las vesículas se fusionen con la membrana de manera rápida y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , en sitios de secreción designados (Liang, Wei, y Chen, 2017).

En las CCs el contenido de los gránulos de secreción es liberado por medio de exocitosis dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Antes de que una vesícula se fusione con la membrana, debe de pasar por un proceso de maduración, comenzando por la biogénesis, siguiendo por la translocación —donde las vesículas son enviadas hacia la membrana plasmática—, después de ser reconocidas como vesículas de secreción. Pero antes de que una vesícula pueda fusionarse con la membrana es necesario pasar por el anclado o “docking” en la membrana plasmática.

Este proceso depende de varias proteínas en la membrana plasmática —sintaxina y SNAP-25—, pertenecientes al grupo SNARE (del inglés, Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor), las cuales son componente clave para formar el complejo proteico necesario para llevar a cabo y regular la fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática. Se ha reportado que la eliminación de la sintaxina o la SNAP-25, suprime el proceso de anclado (Schaub et al., 2006; Wit et al., 2006; de Wit et al., 2009). La Sinaptotagmina-1 —proteína transmembranal que se encuentra en las vesículas y la cual es sensible a  $\text{Ca}^{2+}$ —, se asocia con SNAP-25 para realizar el anclado; a su

vez, la proteína Munc18-1, se une a syntaxina, para estabilizar el complejo formado con SNAP-25 (Lee et al., 2020) Figura 3.

Después de su anclaje, las vesículas experimentan un proceso de preparación o “priming”, el cual depende de ATP y  $\text{Ca}^{2+}$  (Misonou, Ohara-Imaizumi, y Kumakura, 1997) y entre las proteínas involucradas se encuentran sensores a  $\text{Ca}^{2+}$  como son: Sinaptotagmina-1, isoformas de Munc13 (Munc13-1 y ubMunc13-2) y CAPS-1 y -2 (Borisovska et al., 2005), las cuales cuentan con un dominio C2 que puede unirse a  $\text{Ca}^{2+}$ , dándoles la capacidad a las vesículas de entrar en el proceso de fusión frente a una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 3).

Munc13 se une a la syntaxina —favoreciendo su composición abierta—, a la SNAP-25 y la proteína de membrana vesicular sinaptobrevina (VAMP), ambas partes del complejo SNARE, necesario para que la fusión se produzca (de Wit et al., 2009). Una vez que las vesículas han pasado por el proceso de maduración, están listas para ser fusionadas, aunque depende de varias proteínas ancladas a la membrana, como el ya mencionado complejo SNARE.

La manera en la que se previene la fusión de la vesícula con la membrana —durante condiciones en reposo—, es a través de la complexina-2, proteína que se une a la Sinaptotagmina-1 inhibiendo la fusión de la vesícula. Pero en el momento en que el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la Sinaptotagmina-1, la complexina-2 es inactivada, permitiendo la fusión de la misma (Dhara et al. 2014; Krishnakumar et al., 2011).

La maquinaria de fusión se encarga de reconocer las membranas que se van a fusionar y superar las fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre ellas; culminando el proceso con la formación del poro de fusión y la liberación de las CA —en el caso de las CCs— al medio extracelular y luego al torrente sanguíneo (Camacho Pérez et al., 2003).

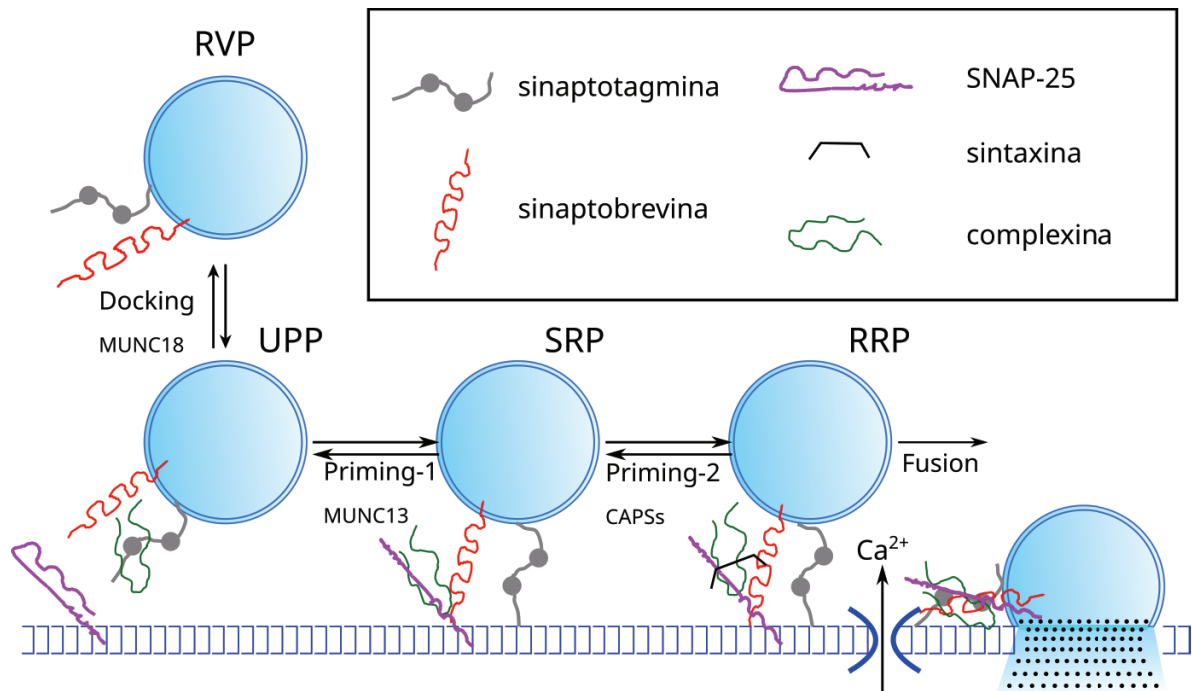
El proceso de maduración de las vesículas es lento y para responder de manera rápida al estímulo, es necesario contar con vesículas que ya han pasado el proceso de maduración. Se han descrito diferentes grupos o pozas de vesículas

que se encuentran en distintas etapas de maduración: cuando se encuentran a más de 200 nm de la membrana plasmática y sí pueden desplazarse hacia la membrana, en caso de ser necesario, se les denomina vesículas de reserva —por sus siglas en inglés RVP, Reserve Vesicle Pool— (García et al., 2006; Plattner et al., 1997; Stevens et al., 2011).

También podemos diferenciar la poza de vesículas ancladas —pero no listas para ser liberadas—por sus siglas en inglés UPP (Unprimed Pool), debido a que deben de pasar por el proceso de preparación o “priming”, antes de ser liberadas.

Una tercera variante es la de liberación lenta —por sus siglas en inglés SRP (Slowly Releasable Pool)—, estas vesículas ya han transcurrido el proceso de anclaje y preparación, pero no por su segunda (priming 2), donde las proteínas CAPS estabilizan la forma abierta de la syntaxina, produciendo el ensamblaje con sinaptobrevina y SNAP-25 (Liu et al., 2008; Pechstein et al., 2015).

La poza de vesículas listas que ya pasaron los dos procesos de “priming”, se denominan RRP (Readily Releasable Pool) y se encuentran en espera de la señal de  $Ca^{2+}$  para entrar en el proceso de fusión. Éstas pueden ser liberadas en milisegundos y a partir de ellas se puede diferenciar otra poza: esta población de vesículas —además de haber pasado por el proceso de maduración — se encuentra más cerca de los CCDV, lo cual facilita su entrada inmediata en fusión —por sus siglas en inglés IRP (Immediately Releasable Pool)— (Sorensen, 2004; Voets et al., 1999).



**Figura 3.** Subpoblaciones de vesículas y el proceso de fusión con la membrana plasmática y exocitosis. RVP (reserve vesicle pool), UPP (unprimed pool), SRP (slowly releasable pool) y RRP (readily releasable pool). Modificado de Marengo y Cárdenas, 2018.

#### 6.4. Señales de calcio en células cromafines

Como se mencionó anteriormente, la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> regula la movilización de vesículas y el proceso de exocitosis de CA en las CCs. Debido a la importancia del Ca<sup>2+</sup> como mensajero intracelular, es necesario que sus niveles se encuentren estrictamente regulados (Liang et al., 2017). En condiciones de reposo la concentración de Ca<sup>2+</sup> extracelular es de alrededor de 2 mM, mientras que el Ca<sup>2+</sup> intracelular es aproximadamente 100 nM. La baja concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular es determinada por los componentes que se encargan de remover el Ca<sup>2+</sup> del citoplasma, como son amortiguadores, bombas e intercambiadores, en tanto que la elevación de Ca<sup>2+</sup> se debe a la entrada de Ca<sup>2+</sup> del medio extracelular a través de los CCDV, el Ca<sup>2+</sup> liberado de los reservorios intracelulares como el ER y las mitocondrias (Berridge, Bootman, y Roderick, 2003).

La generación de potenciales de acción permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio de los CCDV, y este es uno de los principales factores encargados de promover la fusión de las vesículas y la liberación de CA (Augustine y Neher, 1992; Mahapatra et al., 2012). Existen distintos tipos de CCDV y se clasifican dependiendo de su voltaje de activación: canales de alto voltaje de activación (High Voltaje-Activated; HVA) y de bajo voltaje de activación (Low Voltaje-Activated; LVA). Los canales HVA se subdividen en 4 subtipos de canales distintos: tipo L, N, P/Q y R.

Por otro lado los canales LVA, cuentan sólo con un subtipo, el canal de tipo T (Cuchillo-Ibáñez et al., 2002; García et al., 2006). En las CCs de rata, los canales tipo L contribuyen con un 50% de la corriente total de  $\text{Ca}^{2+}$ , los de tipo N aportan el 30% mientras que los canales P/Q sólo un 20% (Gandía et al., 1995).

Además de los CCDV, las CCs cuentan con otros mecanismos capaces de incrementar el calcio intracelular, entre lo que están los reservorios intracelulares — como el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias—. En el caso del RE la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  se produce a través de dos canales-receptores, el receptor a rianodina (RyR) (Xu y Forsberg, 1993) y el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato o  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) (Miyazaki, 1993); en tanto que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RE ocurre por medio de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en el RE (SERCA) (Carafoli, 1987). El receptor a  $\text{IP}_3$ , se activa con la unión del ligando  $\text{IP}_3$ , un segundo mensajero intracelular que se produce, junto con el diacilglicerol, por hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), un fosfolípido de membrana, por la fosfolipasa C, acoplada a una proteína  $G_q$  que se activa por la unión de un agonista a alguno de los receptores metabotrópicos de membrana. La unión del  $\text{IP}_3$  a su receptor incrementa la sensibilidad de  $\text{IP}_3\text{R}$  a  $\text{Ca}^{2+}$  y actúa de dos maneras: en presencia de concentraciones bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  es activado produciendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, pero es inhibido en la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  alto (García et al., 2012; Miyazaki, 1993).

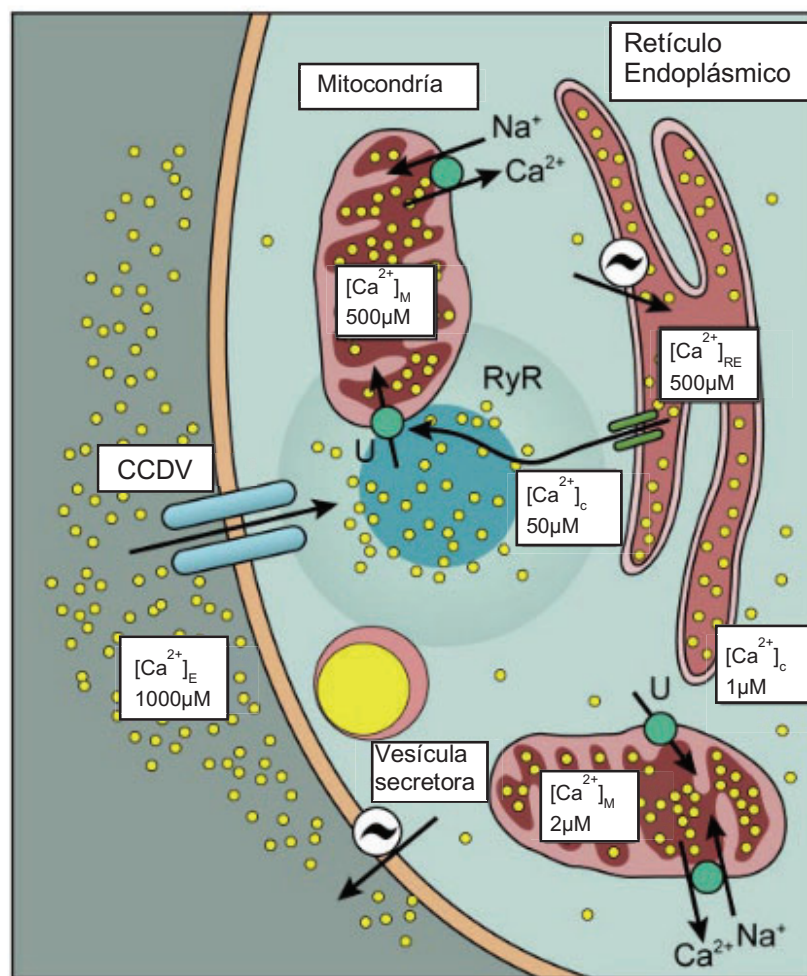
La manera en que los RyRs liberan  $\text{Ca}^{2+}$  es mediante el fenómeno conocido como “Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  Inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ ” — o CICR por sus siglas en inglés: Calcium Induced Calcium Release)— (Alonso et al., 1999). Los RyR se activan a



concentraciones menores de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que los  $\text{IP}_3\text{R}$ , por lo cual es posible activarlos con el  $\text{Ca}^{2+}$ , que entra a través de los CCDV. Al ser activados liberan  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma, lo que ayuda a amplificar la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  y que se propague por el citosol (Berridge et al., 2003; Cuchillo-Ibáñez et al., 2002; García et al., 2012). El nombre de RyR proviene de la rianodina, un diterpenoide venenoso aislado de la planta *Ryania speciosa* que actúa como agonista parcial de los RyRs en el rango nanomolar, mientras que en el rango micromolar actúa como antagonista (J. I. Sutko et al., 1997).

La mitocondria cuenta con dos mecanismos encargados de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol: el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX)—, el cual sustituye tres iones de  $\text{Na}^{2+}$  por cada ion de  $\text{Ca}^{2+}$ , y el intercambiador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (HCX), que introduce dos  $\text{H}^+$  por cada  $\text{Ca}^{2+}$  que libera (Berridge et al., 2003). Además existe el uniportador mitocondrial que transporta  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol a la matriz mitocondrial (Berridge, 2002; Caride et al., 2001).

Otros mecanismos capaces de capturar  $\text{Ca}^{2+}$  para poder mantener la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , son las bombas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del RE y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA: Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), las cual mueven  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol al RE o al espacio extracelular, respectivamente y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) de la membrana plasmática que puede bombear  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el exterior o el interior de la célula, dependiendo del voltaje transmembranal.



**Figura 4.** Vías de entrada y manejo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. CCDV (Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de Voltaje), RE (retículo endoplásmico), RyR (receptor de rianodina). Modificado de García et al., 2006.

## II. MARCO TEÓRICO

Aunque se desconoce el mecanismo exacto que desencadena el desarrollo de la hipertensión esencial, se conocen algunos factores involucrados como los genéticos, el sistema simpatoadrenal, el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) y el manejo de sodio por el riñón (Laflamme et al., 1997; Singh et al., 2010). En este sentido, se han implicado alteraciones del sistema simpatoadrenal en el desarrollo de hipertensión esencial tanto en humanos como en el modelo de la rata espontáneamente hipertensa.

En pacientes con hipertensión se ha reportado un incremento en los niveles de catecolaminas séricas (valores de 0.37 ng/ml) en comparación con los pacientes normotensos (el valor promedio fue de 0.218 ng/ml) (de Champlain et al., 1976). En pacientes con hipertensión esencial también se ha reportado una elevación en la actividad nerviosa simpática —la cual se midió por medio de microneurografía—, al ser comparadas con sujetos normotensos (Grassi et al. 1998). Resultados similares fueron registrados en pacientes jóvenes cuyos padres tienen historial de hipertensión, reportando valores elevados de catecolaminas y un incremento de la frecuencia cardíaca basal (Julius et al., 1991).

En el modelo de estudio de hipertensión arterial con la rata espontáneamente hipertensa, se han descrito resultados similares: los valores de adrenalina y noradrenalina séricos son mayores en las ratas SHR comparadas con las ratas Wistar Kyoto (WKY), su control normotenso (Goldstein, 1983; Grassi et al., 1998; Pak, 1981).

Los valores plasmáticos de noradrenalina en SHR fueron de  $356 \pm 67$  pg/ml y de  $297 \pm 61$  pg/ml en las ratas WKY; por otro lado, los valores de adrenalina fueron de  $1079 \pm 117$  pg/ml en las ratas SHR y de  $695 \pm 107$  pg/ml en el control normotenso la rata WKY (Vlachakis et al., 1980). Además de los niveles incrementados de catecolaminas, también se ha reportado un aumento en la actividad nerviosa simpática en las ratas SHR (Flaa et al., 2006; Lundin y Hallback-Nordlander, 1980; Mancia et al., 1999).

En un trabajo realizado en ratas SHR, se demostró que al realizar una simpatectomía química, un tratamiento de antisuero contra el factor de crecimiento neural, (en inglés: Nerve Growth Factor) y guanetidina —durante las primeras 4 semanas de edad—, se logró prevenir o atenuar el desarrollo de hipertensión en las ratas SHR, presentando entre las 28 a las 30 semanas un valor promedio de presión sistólica de  $139 \pm 2$  mm Hg; mientras que en las ratas SHR —que no fueron tratadas en la misma edad— el valor promedio fue de  $195 \pm 8$  mm Hg. Además, no se afectaron los valores de presión sistólica en el grupo control (las ratas WKY en

la misma edad), que fueron de  $112 \pm 5$  mm Hg, mientras que valores similares se reportaron en ratas WKY sin tratamiento  $115 \pm 4$  mm Hg. Sin embargo, los valores de presión arterial siguen siendo algo más elevados en las ratas SHR tratadas que en el grupo normotenso. Sumado a esto, la hipertrofia cardíaca que se desarrolla durante la hipertensión se siguió presentando en las ratas SHR tratadas. Esto podría deberse a que otros sistemas se encuentran también alterados y participan en el desarrollo de la hipertensión (Lee et al., 1987).

Trabajos posteriores demostraron que la simpatectomía química, combinada con la desmedulación (eliminación de la medula adrenal) bilateral, a las 4 semanas de edad, reducía los niveles de la presión arterial sistólica en las ratas SHR ( $120 \pm 6$  mm Hg) a valores muy similares a los reportados en las ratas normotensas WKY ( $108 \pm 1$  mm Hg), y no se observó hipertrofia cardíaca en las ratas SHR tratadas. Estos resultados sugieren fuertemente la participación tanto del sistema nervioso simpático como de la glándula suprarrenal en el desarrollo de la hipertensión arterial (Lee et al., 1991).

Varios estudios han sido realizados para poder medir diferencias en la liberación de CA por las CCs, en la glándula suprarrenal de las ratas SHR comparadas con la rata WKY, utilizando ACh o  $K^+$  para estimular la despolarización de las CCs y con esto, la liberación de CA. Lim et al. (2002), observaron que, con ambos estímulos, las granulas suprarrenales aisladas de ratas SHR (ACh:  $533 \pm 33$  ng,  $K^+$ :  $278 \pm 22$  ng) liberan más catecolaminas que las ratas control WKY (ACh:  $320 \pm 21$  ng, alto  $K^+$ :  $198 \pm 16$  ng); estos resultados se obtuvieron utilizando la técnica de fluometría.

Por otro lado, la técnica de amperometría permite medir la cantidad de CA secretadas por granulo de secreción y cuenta con una resolución temporal para medir parámetros cinéticos que indiquen posibles diferencias en la dinámica de secreción de los gránulos (Albillos et al. 1997). De esta manera, mediante el uso de esta técnica, Miranda-Ferreira et al. (2008) demostraron que, tras ser estimuladas por 2 seg con ACh 1 mM o 70 mM  $K^+$ , las CCs de ratas SHR de 16 semanas tenían

un incremento significativo en la cantidad de CA secretadas en comparación con las ratas Sprague-Dawley de la misma edad (como control). Más recientemente, en nuestro laboratorio, Segura-Chama et al. (2015) observaron que las ratas SHR de 7-12 semanas de edad (en la etapa inicial de la hipertensión) liberan una mayor cantidad de CA al ser comparadas con ratas WKY de la misma edad como control normotenso.

Existen varios reportes donde se han investigado diferentes mecanismos que podrían estar involucrados en el incremento de liberación de CA en las ratas SHR. Como se describió anteriormente, las señales de  $Ca^{2+}$  son una parte fundamental para el proceso de exocitosis; uno de los elementos más importantes es la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los CCDV. Segura-Chama et al. (2010), estudiaron las corrientes de  $Ca^{2+}$  por medio de electrofisiología en CCs en rebanadas de glándula suprarrenal en ratas SHR y WKY de 7-12 semanas, y no observaron diferencias en las corrientes de  $Ca^{2+}$  registradas en ambas cepas. Esto implica que una mayor entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los CCDV no parece estar involucrada en la secreción aumentada de CA en las ratas SHR.

Otros mecanismos que también podrían estar involucrados en la entrada y regulación de  $Ca^{2+}$  intracelular son las pozas intracelulares (RE y mitocondria), capaces de almacenar y liberar  $Ca^{2+}$ . Al respecto, Segura-Chama et al. (2015), observaron que después de incubar CCs de ratas SHR y WKY de 7-12 semanas en cultivo celular con 10  $\mu$ M de rianodina, por 10 minutos —la cual funciona como antagonista de los receptores de rianodina (RyR) en el RE — y siendo estimuladas con  $K^+$  60 mM, la cantidad de CA liberadas por ambas cepas, fue muy similar. En las CCs de las ratas WKY no se observó reducción en la cantidad de CA liberadas antes o después de la incubación con Ry, mientras que en las CCs de las ratas SHR, la cantidad de CA se redujo a valores similares a los detectados en las CCs de WKY. Estos resultados sugieren con claridad, que los RyR participan en el incremento de secreción de CA que acompaña a la hipertensión.

Otro posible factor involucrado en el aumento de liberación de CA es el número de gránulos de secreción y la cantidad de CA por gránulo. En este sentido,

Musial et al. (2017), encontraron que no existe diferencia en el tamaño de los gránulos entre CCs de ratas SHR hipertensas de 16 semanas, comparadas con CCs de WKY de la misma edad. Sin embargo, la densidad de gránulos en las CCs de ratas SHR (21.5 + 2.3) resultó ser el doble que en las CCs de ratas WKY (10.7+ 0.6).

Por otro lado, Li et al. (2012) midieron las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior de ratas SHR prehipertensas (4-7 días de edad) y en ratas jóvenes (4-6 semanas), detectando que, al ser despolarizadas con  $\text{K}^+$ , se producía un aumento significativamente mayor de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en las neuronas simpáticas de ratas SHR, al ser comparadas con ratas WKY de la misma edad.

Lo anterior sugiere que la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas de las ratas SHR se encuentra alterada desde etapas tempranas, pudiendo ser uno de los factores involucrados en el desarrollo de hipertensión esencial. En neuronas simpáticas del ganglio estelar —de donde derivan fibras posganglionares simpáticas que inervan el corazón—, en ratas SHR prehipertensas (4-5 semanas) se encontraron señales elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y menor actividad del transportador de noradrenalina —en inglés, Noradrenaline Transporter NET—, encargado de remover la NA después de la liberación en la hendidura sináptica. Estos resultados podrían estar asociados con alteraciones que contribuyen al desarrollo de hipertensión esencial y complicaciones cardiovasculares asociadas a la misma en ratas SHR (Shanks et al., 2013; Shanks et al., 2017).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo estudiamos las posibles alteraciones en la liberación de CA y señales de  $\text{Ca}^{2+}$  en las CCs de ratas SHR prehipertensas (4-5 semanas) y su control WKY de la misma edad, así como posibles alteraciones en el número de gránulos en las CCs de ratas SHR prehipertensas, con la finalidad de analizar la contribución de las CCs en el desarrollo temprano de la hipertensión esencial.

### **III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

La hipertensión esencial es una de las principales enfermedades cardiovasculares a escala mundial cuya causa sigue sin conocerse, aunque se han identificado diferentes factores involucrados en su desarrollo. Se han asociado alteraciones en la liberación de CA por el SNA y las CC de la glándula suprarrenal con desarrollo de la hipertensión esencial.

En etapas iniciales de la hipertensión se ha demostrado un incremento en la liberación de CA por las CCs de ratas SHR (Segura-Chama et al., 2015); mientras que en neuronas simpáticas, las alteraciones en las señales de  $Ca^{2+}$  intracelular se reportan —en esta misma cepa— desde edades neonatales o prehipertensivas (Li et al., 2012; Shanks et al., 2013).

Por consiguiente, en este trabajo nos enfocamos en estudiar la etapa prehipertensiva de las ratas SHR, en la que los valores de presión arterial son normales, con la finalidad de detectar posibles alteraciones tanto en la liberación de CA como en las señales de  $Ca^{2+}$  que podrían ayudar a comprender uno de los mecanismos involucrados en el desarrollo temprano de la hipertensión esencial.

### **IV. HIPÓTESIS**

Si en la etapa inicial de la hipertensión —en ratas SHR—, se produce un aumento de la secreción catecolaminas por una mayor liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico —en las CCs—, es posible que lo mismo ocurra en la etapa previa; promoviendo un aumento en la secreción de catecolaminas previa al desarrollo de la hipertensión.

## V. OBJETIVO

Caracterizar la secreción de catecolaminas y las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en CCs de ratas SHR prehipertensas (SHRpre) en comparación con las CCs de las ratas WKY de la misma edad.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si en las CCs de ratas SHRpre hay una mayor liberación basal de CA comparada con CCs de ratas WKY de la misma edad.
- Investigar si en las CCs de ratas SHRpre hay una mayor liberación estimulada de CA al ser despolarizadas con una solución de alto  $\text{K}^+$ , comparada con CCs de ratas WKY de la misma edad.
- Analizar si en las CCs de ratas SHRpre hay una mayor liberación de CA al estimular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares con cafeína, en comparación con CCs de ratas WKY de la misma edad.
- Estudiar la participación de los RyR y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las pozas intracelulares en la secreción de CA en CCs de ratas SHRpre comparadas con CCs de ratas WKY de la misma edad.
- Comparar la densidad y tamaño de los gránulos de secreción entre CCs de ratas SHRpre y WKY de la misma edad.
- Comparar las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducidas por despolarización o liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares entre CCs de ratas SHRpre y WKY de la misma edad.



## **VII. METODOLOGÍA**

### **1. Animales**

Los experimentos en animales fueron realizados con apego a la Norma para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA NOM-062-Z00-1999) y aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología Celular (CICUAL-IFC: protocolo #AHC24-141). Las ratas fueron obtenidas de la Unidad Académica Bioterio del Instituto de Fisiología Celular; y las colonias de SHR y WKY fueron establecidas gracias a la Dra. Claudia V. Rivera Cerecedo, Jefa de la Unidad Académica Bioterio, a partir de un grupo reproductor de cada cepa adquiridos de Charles River Laboratories; 18 ratas SHR prehipertensas (SHRpre: 4-5 semanas de edad), 15 WKY de la misma edad fueron utilizadas durante este estudio, así como 15 ratas SHR hipertensas (SHRhip: 12 semanas de edad) y 12 WKY de la misma edad. Los animales fueron mantenidos a temperatura controladas de 22 °C y un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad, recibiendo agua y alimento *ad libitum*.

### **2. Monitoreo de la presión arterial**

El monitoreo de la presión arterial se realizó en ratas macho WKY y SHR — en diferentes edades (4-5 semanas y 12 semanas)— mediante una técnica indirecta no invasiva, utilizando un pletismógrafo (Modelo LE 5002, Panlab Harvard Apparatus), diseñado para medir la presión arterial en la cola de roedores. Todas las mediciones fueron realizadas en un cuarto a 20 °C y en silencio, para reducir el estrés de los animales y que la medición de la presión arterial no fuera afectada.

Para llevar a cabo la medición de la presión arterial es necesario que exista vasodilatación, para lo cual las ratas fueron colocadas en un colchón térmico con temperatura controlada a 30 °C por alrededor de 30 minutos. Después de la vasodilatación fueron pesadas en una báscula y colocadas posteriormente en un cepo para mantenerlas inmóviles y así evitar errores en las mediciones.

Posteriormente, el cepto se posicionó dentro de una cámara térmica y se dejó la cola de la rata expuesta al exterior del cepto, para colocar el sensor conectado al pletismógrafo. Después de confirmar que la señal obtenida por el sensor es estable, se procedió a medir tres veces la presión arterial y los latidos por minuto.

La evaluación de la presión arterial de las ratas fue realizada 3 días antes de ser usadas para experimentos, de dichas mediciones se calculó el promedio (Tabla 1). Se consideraron como hipertensas aquellas con valores de presión sistólica  $\geq$  140 mm Hg.

### **3. Cultivo de células cromafines**

Para realizar los cultivos primarios de células cromafines se utilizaron ratas SHR prehipertensas de 4-5 semanas de edad y WKY de la misma edad, así como SHR hipertensas de 12 semanas de edad y WKY de la misma edad. Los cultivos de células cromafines se realizaron como ha sido reportado (Segura-Chama et al., 2015). En el último día en el que se les midió la presión arterial, las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de ketamina (75 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y sacrificadas mediante decapitación.

Las glándulas adrenales fueron retiradas y colocadas en una solución salina Krebs-Ringer (K-R) con la siguiente composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 10 glucosa saturada con 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>, para mantener el pH=7.4. Enseguida se limpió el exceso de grasa de las glándulas, así como la cápsula y la corteza —bajo un microscopio estereoscópico, para después colocar el tejido restante; en este caso la médula de la glándula suprarrenal, en un tubo con 10 ml de medio HBSS (Hanks Balanced Salt Solution: Life Technologies Invitrogen) a un pH=7.4 suplementado con 7.5% de Albumina Serica Bovina (Life Technologies Invitrogen) y 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina (GIBCO), para la digestión enzimática se le adiciono 2 mg/ml de enzima Colagenasa tipo 1 (Worthington Biochem Corp) y 2 mg/ml de DNasa tipo 1 (Sigma-Aldrich). Se dejó incubando el tejido por 20 min a 37 °C, con agitación continua.

Después de la digestión enzimática, el tejido se centrifugó a 1000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y el tejido fue lavado con medio HBSS dos veces. Después de los lavados se agregaron 2 ml de medio HBSS y el tejido fue disociado mecánicamente con una pipeta Pasteur pulida y siliconizada, para después ser centrifugado por 5 min a 1000 rpm. Se retiró el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 0.5 ml de medio HBSS. Las células cromafines fueron sembradas colocando 50 uL de medio en cubreobjetos redondos de 35 mm de diámetro, esterilizados y previamente tratados con poli-L-lisina (100 ug/ml). La suspensión de células cromafines se dejó sedimentar por 30 minutos, para después añadir 1 ml de medio DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, GIBCO) previamente suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO), 1% antibiótico Penicilina-Estreptomicina (GIBCO) y 80 nM de insulina. La placa con el cultivo de células cromafines se colocó en una incubadora con una atmósfera saturada de humedad y 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. El cultivo fue utilizado para realizar experimentos dentro de las 24-48 horas posteriores.

#### **4. Técnica de amperometría**

La técnica de amperometría fue descrita —por primera vez— por el grupo de Mark Wightman en los años 90 (Wightman et al., 1991). La técnica consiste en utilizar un microelectrodo de fibra de carbono —que funciona como aceptor de electrones— y es polarizado a un voltaje superior al potencial de oxidación de la sustancia a detectar (en el caso de las catecolaminas a 700 mV), para después ponerlo en contacto con la superficie de células capaces de secretar sustancias susceptibles de sufrir oxidación, como es el caso de las CA. Las moléculas liberadas serán oxidadas produciendo la pérdida de electrones (dos en el caso de la noradrenalina y adrenalina). La corriente generada tras la liberación del contenido de cada gránulo de secreción genera una espiga amperométrica que tiene características cinéticas y proporciona información acerca de la cantidad de moléculas liberadas y también acerca del proceso de liberación.

#### **4.1. Electrodo de fibra de carbono**

Se utilizaron fibras de carbono de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro y se introdujeron en la punta de polipropileno para micropipeta, con la finalidad de reducir la atracción estática entre la fibra de carbono y el polipropileno. Después, el extremo de la punta fue colocado en el interior de una resistencia caliente hasta que se ablandara, para después aplicar tracción en dirección contraria y recubrir la fibra. Enseguida, se observó bajo un microscopio estereoscópico, donde se hizo un corte de la punta para eliminar el material restante de polipropileno resultado de la tracción. Para finalizar se acercó la punta a la resistencia caliente para retraer el polipropileno de la punta y así dejar 0.5-1 mm de la fibra de carbono expuesta.

Antes de conectarse con el cabezal del amplificador, se rellenó el final del microelectrodo con mercurio para proveer un medio conductor. Además, con la finalidad de utilizar microelectrodos homogéneos en los registros, fueron calibrados utilizando un pulso con una solución de 50  $\mu\text{M}$  de adrenalina y sólo aquellos microelectrodos que produjeron una corriente de al menos 200 pA, fueron utilizados en los experimentos.

#### **4.2. Registros amperométricos**

Para realizar los registros amperométricos, los microelectrodos se conectaron al cabezal del amplificador (HEKA EPC-10, HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania). Los cubreobjetos de vidrio con CCs se colocaron en el fondo de una cámara de registro fijada a la platina de un microscopio vertical (Eclipse FNI, Nikon, Tokio, Japón) con un objetivo de 20x. La imagen se obtuvo utilizando una cámara CCD conectada al microscopio y visualizada en un monitor. Los cultivos fueron mantenidos a perfusión continua con una solución Krebs Ringer-HEPES con la siguiente composición mM: 135 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Glucosa y 15 mM HEPES, y pH=7.4 ajustado con NaOH.

Para medir la liberación de CA por las CCs, el microelectrodo se colocó con ayuda de un micromanipulador (MPC-200 Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) hasta hacer contacto con la membrana de las CCs. El microelectrodo se mantuvo a +700 mV y los registros se adquirieron a una frecuencia de 4 kHz. Las espigas amperométricas fueron capturadas con el software Patchmaster (HEKA Electronics, Lambrecht, Alemania).

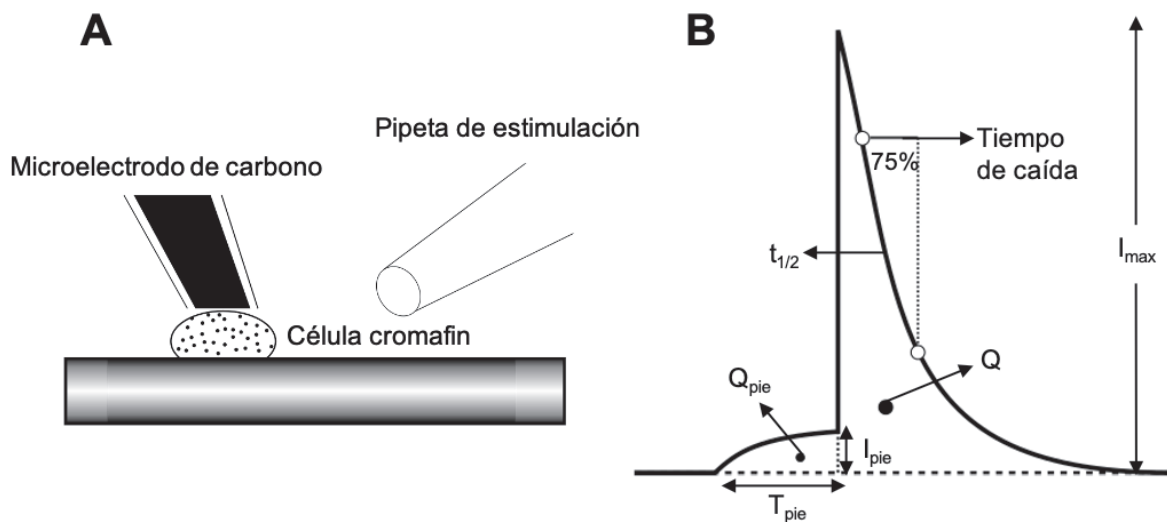
En este estudio utilizamos diferentes protocolos de registro, con la finalidad de avanzar en los objetivos planteados. En todos los registros se utilizaron válvulas electromecánicas para aplicar los estímulos (Modelo ALA-VM4, ALA Scientific Instruments), como se describe a continuación:

- a) Se realizaron registros de la actividad basal de secreción —por 5 minutos — en las CCs de SHRpre y SHRhip, así como de sus controles WKY de la misma edad. Después de cada registro basal se aplicó uno de los estímulos, como se explica en los siguientes puntos.
- b) Se expusieron las CCs a un pulso de 5 segundos de una solución con  $K^+$  60 mM, con la siguiente composición mM: KCl 60 mM, NaCl 80 mM,  $CaCl_2$  2 mM, HEPES 10 mM, y ajustada a pH=7.4, con el objetivo de despolarizar la célula, activar los CCDV y generar la exocitosis de CA. La respuesta producida se monitoreó durante los siguientes 2 minutos.
- c) Para evaluar la influencia de la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular en el aumento de la secreción de CA, se aplicó durante 10 segundos un pulso de 10 mM de cafeína disuelta en Ringer Krebs-HEPES. La respuesta producida fue también monitoreada por los siguientes 2 minutos.
- d) Para finalizar, se evaluó la contribución de los RyR en la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular y con ello el aumento de la secreción de CA. Se realizó el registro basal de secreción en las CCs, seguido por un pulso con alto  $K^+$  por 5 segundos, para después ser incubadas con Rianodina (Ry) por 10 minutos a una concentración 10  $\mu$ M, la cual antagoniza los RyR. Pasados los 10 minutos se aplicó un pulso con alto  $K^+$  por 5 segundos. Se comparó la respuesta de despolarización con alto  $K^+$  de la misma célula antes y después de la incubación con Ry.

### 4.3. Análisis de las espigas amperométricas

Las espigas amperométricas —obtenidas de manera espontánea o bien durante la estimulación con las diferentes sustancias antes mencionadas— fueron analizadas utilizando el programa Quanta Analysis 8.20, en Igor Pro5.0 (Wavemetrics, Portland, OR., USA). Para calcular los parámetros cinéticos, primero es necesario determinar la línea basal, la cual servirá como referencia para detectar el umbral de una espiga. Para nuestro estudio se colocaron dos cursores (en espacios) en el registro libre de espigas y se tomaron dos desviaciones estándar del ruido —como el umbral— para ser considerada como una espiga amperométrica. Los parámetros cinéticos que se calcularon por espiga amperométrica se describen a continuación (Figura 5):

- La carga (**Q**), se expresa en pico Coulomb (**pC**) y se obtiene a partir de la integración del área bajo la curva, la cual se relaciona con el contenido de CA de una vesícula que fue oxidado.
- La amplitud máxima de corriente (**I<sub>max</sub>**) hace referencia a la concentración máxima alcanzada por las moléculas que son oxidadas en la superficie del electrodo. Para expresar este parámetro se utilizan unidades de pico Amperios (**pA**).
- El tiempo medio (**t<sub>1/2</sub>**), corresponde al ancho de la espiga a la mitad de la amplitud máxima, indica el tiempo que tardan en liberarse las CA a través del poro de fusión. Se expresa en milisegundos (**ms**).
- En algunos casos las espigas presentan un pie, en inglés foot (**F**), esto se produce cuando el poro de fusión se abre previamente a la expansión completa y libera una pequeña cantidad de CA (Mosharov y Sulzer 2005). Es posible medir parámetros cinéticos para el pie (**I<sub>foot</sub>**, **T<sub>foot</sub>** y **Q<sub>foot</sub>**), pero para este estudio, en las espigas que contaban con un pie, se midió la carga (**Q<sub>foot</sub>**) y se le sumó a la carga total de la espiga.



**Figura 5.** Registros amperométricos. A) Representación de un registro amperométrico en células cromafines. B) Representación mostrando los parámetros cinéticos analizados en una espiga amperométrica.

## 5. Señales de calcio intracelular

Para realizar los registros de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cubreobjetos donde se sembraron las CCs se incubó con  $2 \mu\text{M}$  del indicador fluorescente sensible a calcio Fluo-4 AM (Molecular Probes, Life Technologies), a temperatura ambiente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, el cubreobjetos se lavó con solución Krebs Ringer-HEPES y se colocó en una cámara montada en un microscopio invertido (Nikon Eclipse 80i, Japón), con un objetivo 40x de inmersión en agua (Nikon, apertura numérica 0.8), con perfusión continua con Krebs Ringer-HEPES con la siguiente composición (mM): NaCl 145, KCl 3.0,  $\text{MgCl}_2$  2.0,  $\text{NaHCO}_3$  1.0,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5, HEPES 5.0,  $\text{CaCl}_2$  2.0 y glucosa 5.0, ajustado a un  $\text{pH} = 7.4$  con NaOH.

El fluoróforo Fluo-4 AM es excitado a 488 nm, por lo cual se utiliza un láser de argón (Laser Physics, Reliant 100 s488, West Jordan, UT). La fluorescencia emitida fue filtrada (510 nm) antes de ser captada por una cámara CCD (Andor Technology iXon 897, Oxford Instruments, High Wycombe, UK). Las imágenes fueron adquiridas con 10 ms de exposición, 1 imagen cada 500 ms. El protocolo de

registro se llevó a cabo como se explica a continuación: se adquirieron 60 s de actividad espontánea, seguido por un pulso de 5 s con una solución de alta concentración de K<sup>+</sup> con la siguiente composición (mM): KCl, NaCl 90, CaCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10 mM para producir la despolarización de las CCs y con ello la entrada de Ca<sup>2+</sup>. Después de 60 s, se aplicó un pulso de 10 s con una solución de cafeína 10 mM en Krebs Ringer-HEPES, con la finalidad de producir liberación de Ca<sup>2+</sup> de pozas intracelulares. Se continuó adquiriendo imágenes por 180 s. En total los registros tuvieron una duración de 300 s con 600 imágenes.

### **5.1. Análisis de las señales de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

Para el análisis de las señales de Ca<sup>2+</sup> se utilizó el programa Image J versión 1.38 (National Institutes of Health). Las imágenes capturadas se convirtieron en formato TIFF. Las células se seleccionaron mediante regiones de interés en el registro (ROIs), y por medio de ellos se calcularon los cambios de fluorescencia ( $\Delta F$ ) en cada una de las células en el registro. Para ello se utilizó la siguiente fórmula.

$$\Delta F = F_{(i)} - F_0$$

$F_0$  es el resultado de hacer un promedio de las primeras 5 imágenes del registro.

$F_i$  es cualquier imagen que se encuentra en el registro

## **6. Microscopia electrónica de transmisión**

Las muestras fueron preparadas como en Gimenez-Molina et al. (2017). Se comienza por retirar las glándulas suprarrenales, para después colocarlas en una solución Krebs-Ringer (K-R) con la siguiente composición (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 10 glucosa, saturada con 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub> para mantener el pH=7.4.

Estando en la solución K-R, se procedió a limpiar las glándulas bajo un microscopio estereoscópico, donde se eliminó la grasa y a continuación se cortaron cubos de 2-3 mm<sup>3</sup> y se depositaron en tubos Eppendorf. Los cubos de tejido se



fijaron con una solución que consiste en: 2.5% glutaraldehído diluido en buffer de cacodilato a una concentración 0.2 M y con un pH= 7.2. Después de añadir la solución fijadora en cada uno de los tubos con tejido, se mantuvieron a 4°C durante 6 horas. Posteriormente, se retiró la solución y se lavaron los bloques de tejido con buffer de cacodilato 0.2 M. Después del lavado, las muestras fueron sometidas a un proceso de post-fijación mediante incubación con tetraóxido de osmio 1% en buffer de cacodilato 0.2 M por 2 horas a 4°C. Al finalizar la post-fijación se lavaron las muestras con buffer de cacodilato 0.2 M, 3 veces y por 10 minutos cada vez. A continuación, las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% por 2 horas a 4 °C. Después del contraste, se lavaron las muestras con buffer de cacodilato 0.2 M y se siguió a la deshidratación mediante una serie de incubaciones en etanol de diferentes grados de pureza 30%, 50%, 70%, 95% durante 15 minutos cada una de ellas y 99% dos veces por 15 minutos. Al terminar las deshidrataciones, se inició la fase de aclaramiento la cual consistió en incubar las muestras por 30 minutos en óxido de propileno. Para finalizar los tejidos se embebieron en resina Epoxi y se dejó solidificar por 48 h a 60 °C.

Una vez obtenidos los bloques en resina epoxi se obtuvieron cortes ultrafinos (70 nm) usando un ultramicrotomo (Reichert-Jung Ultracut) y los cortes se transfirieron a gradillas de cobre para ser tratados con acetato de uranilo por 5 min y citrato de plomo por 1 min, para potenciar un buen contraste y mejorar así la calidad de la imagen al ser observadas en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL-JEM-1200) equipado con una cámara digital CCD (Orius GATAN).

## **7. Análisis de datos y estadística**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0 para Windows (San Diego, California, USA), los resultados se expresan como media  $\pm$  ESM. Se utilizó la prueba t-student, y en algunos casos ANOVA de una vía seguido por una posprueba de Tukey. Para el análisis de transmisión de electrones, se midió el área de las CC individuales dentro de los límites de la membrana plasmática, excluyendo el núcleo y utilizando el programa Image J versión 1.38 (National

Institutes of Health); además se utilizó un plug-in en el mismo programa para detectar automáticamente partículas (vesículas) y el área de las vesículas. Para establecer diferencias estadísticas entre los grupos diferentes grupos de secreción en las ratas SHRpre, se utilizó ANOVA de una vía seguido por una posprueba Dunnett. Por otra parte, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comparar la distribución del tamaño de los gránulos en los CCs. Los datos se presentan como media  $\pm$  ESM, con un nivel de significancia establecido en  $p < 0.05$ .

## VIII. RESULTADOS

### 1. Comparación de la presión arterial en ratas SHR y WKY.

En la Tabla 1 se muestran los valores de presión arterial —y de frecuencia cardíaca— de ratas SHR (con diferentes edades) utilizadas en este estudio, así como su control normotenso WKY en la misma edad. Los valores de presión arterial sistólica y diastólica en las ratas de 4-5 semanas — $109.6 \pm 2$  y  $83 \pm 2$  mmHg en SHRpre— fueron muy similares a los determinados en ratas WKY, de la misma edad, los cuales fueron de  $114.2 \pm 3$  y  $80 \pm 2$  mmHg, sistólica y diastólica, respectivamente (SHRhip  $n=14$ , WKY  $n=12$ , SHRpre  $n=18$  y WKY  $n=15$ ).

Por el contrario, en las ratas de SHRhip —de 12 semanas— los valores de presión arterial sistólica y diastólica fueron de  $154 \pm 3$  y  $106 \pm 4$  mmHg y de  $109 \pm 2$  y  $80 \pm 2$ , en WKY de la misma edad.

**Tabla 1.** Valores promedio de presión arterial y frecuencia cardíaca en SHRpre, SHRhip y WKY de la misma edad de cada uno de los grupos. Los datos representan la media  $\pm$  ESM  
\* $p < 0.05$ .

	<b>Pulso/min</b>	<b>Sistólica (mmHg)</b>	<b>Diastólica (mmHg)</b>
<b>WKY</b> (12 sem) n= 12	360 $\pm$ 14	109 $\pm$ 2	80 $\pm$ 2
<b>SHRhip</b> (12 sem) n= 14	444 $\pm$ 10*	154 $\pm$ 3*	106 $\pm$ 4*
<b>WKY</b> (4-5 sem) n= 15	364 $\pm$ 15	114 $\pm$ 3	80 $\pm$ 2
<b>SHRpre</b> (4-5 sem) n=18	360 $\pm$ 12	109 $\pm$ 2	83 $\pm$ 2

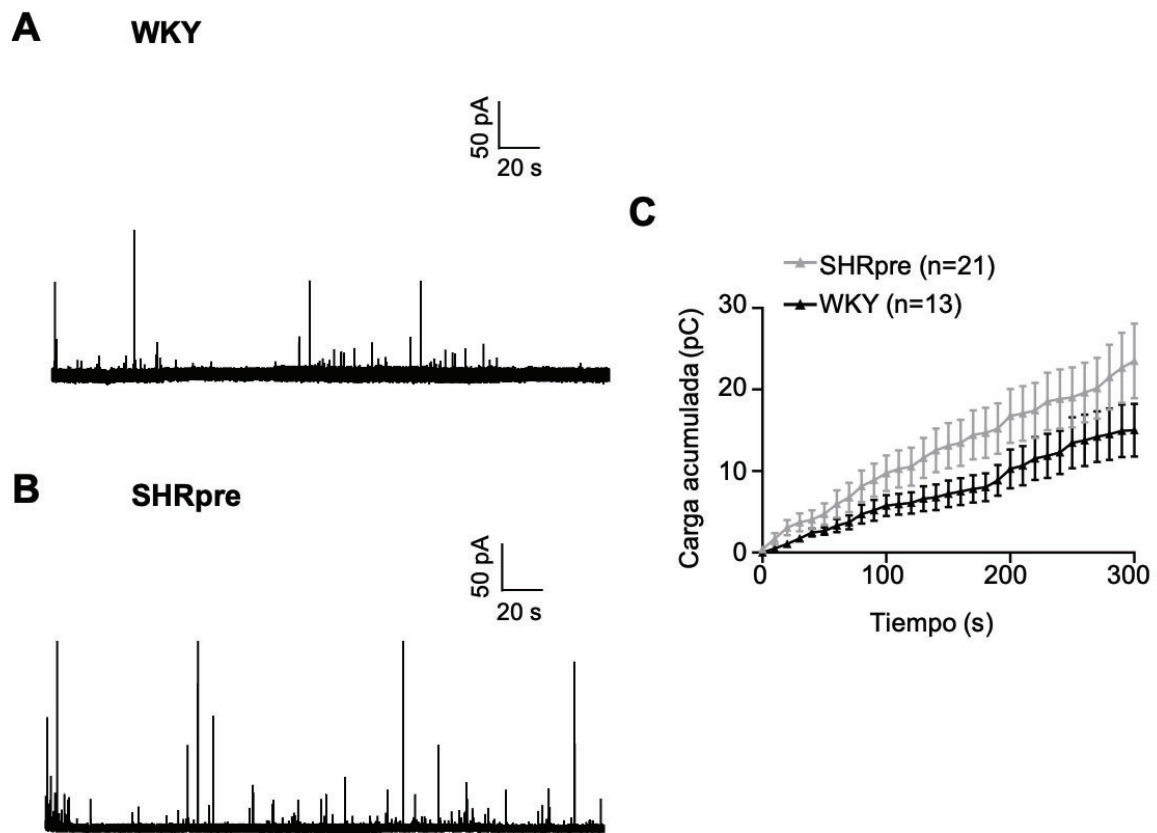
## 2. Secreción basal de catecolaminas en CCs de ratas SHR prehipertensas y WKY de la misma edad.

Se registraron CCs de ratas SHRpre y WKY de la misma edad por medio de la técnica de amperometría, con la finalidad de medir la liberación de CA en condiciones basales. Solo las CCs que respondieron posteriormente al estímulo ( $K^+$  o Cafeína) fueron consideradas para este análisis; de las CCs de ratas WKY (4-5 semanas), el 81.2% presentaron liberación espontánea mientras que en las CCs de ratas SHRpre fue el 87.5%.

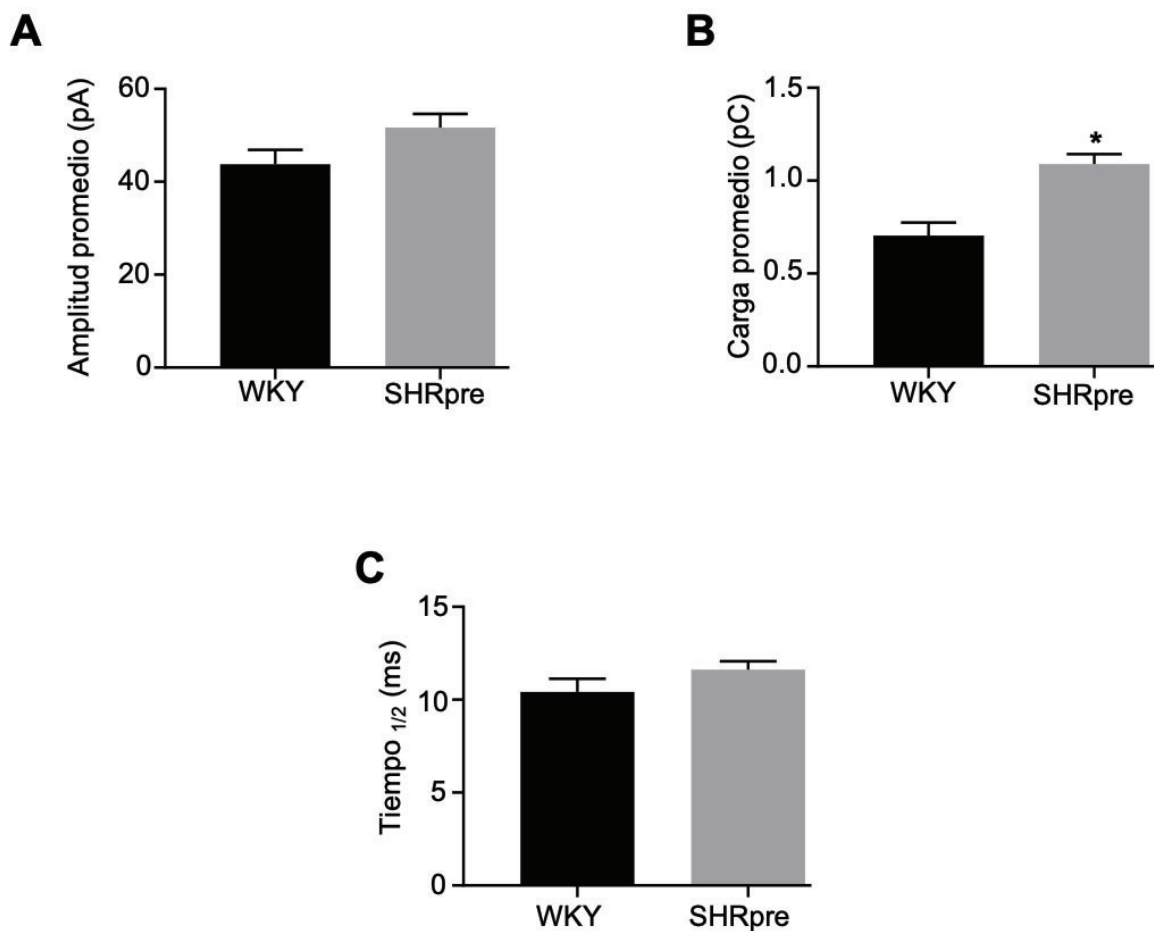
En la Fig. 6A-B, se muestran los registros de amperometría obtenidos de CCs en condiciones basales. Para comparar la liberación de CA, a lo largo del tiempo, se calculó la carga acumulada en función del tiempo de ambas cepas (23.5  $\pm$  4.5 pC en SHRpre vs 15.1  $\pm$  3.2 pC en WKY); aunque fue ligeramente mayor en las ratas SHRpre, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.18$ ) Fig. 6C.

Se evaluaron los distintos parámetros cinéticos de las espigas (Tabla 2, Figura 7). De estos, sólo la carga por espiga fue mayor en las CCs de ratas SHRpre, 1.08  $\pm$  0.05 pC ( $p=0.002$ ) mientras que en las ratas WKY de la misma edad fue de 0.70  $\pm$  0.06 pC (Fig. 7B).

Con la finalidad de comparar si las CCs de ratas SHRpre liberan gránulos de mayor tamaño o de mayor contenido de CA, se muestra en la Fig. 10A el histograma de distribución con respecto a la amplitud de las espigas. Al evaluar la amplitud de las espigas de cada una de las cepas se encontró que las CCs de SHRpre presentan una mayor proporción de espigas en el rango de 190-290 pA, 7.2 %, comparado con CCs de WKY en las cuales las mismas espigas grandes representan sólo el 3.7% (Tabla 3).



**Figura 6.** Liberación de CA en CCs de ratas SHRpre y WKY de 4-5 semanas en condiciones basales. A-B) Trazos representativos de la liberación de CA en CCs de ratas WKY de 4-5 semanas (A) y de SHRpre (B). C) Carga acumulada de las espigas amperométricas de CCs de ratas WKY de 4-5 semanas (triángulos negros) y de SHRpre (triángulos grises). Cada punto representa la media  $\pm$  ESM, n representa el número de CCs registradas.



**Figura 7.** Gráficas de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en CCs de WKY de 4-5 semanas (n=175) y SHRpre (n=370) en condiciones basales. A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo $_{1/2}$ . Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM, \* $p < 0.05$ .

### 3. Secreción basal de catecolaminas en CCs de ratas SHR hipertensas y WKY de la misma edad.

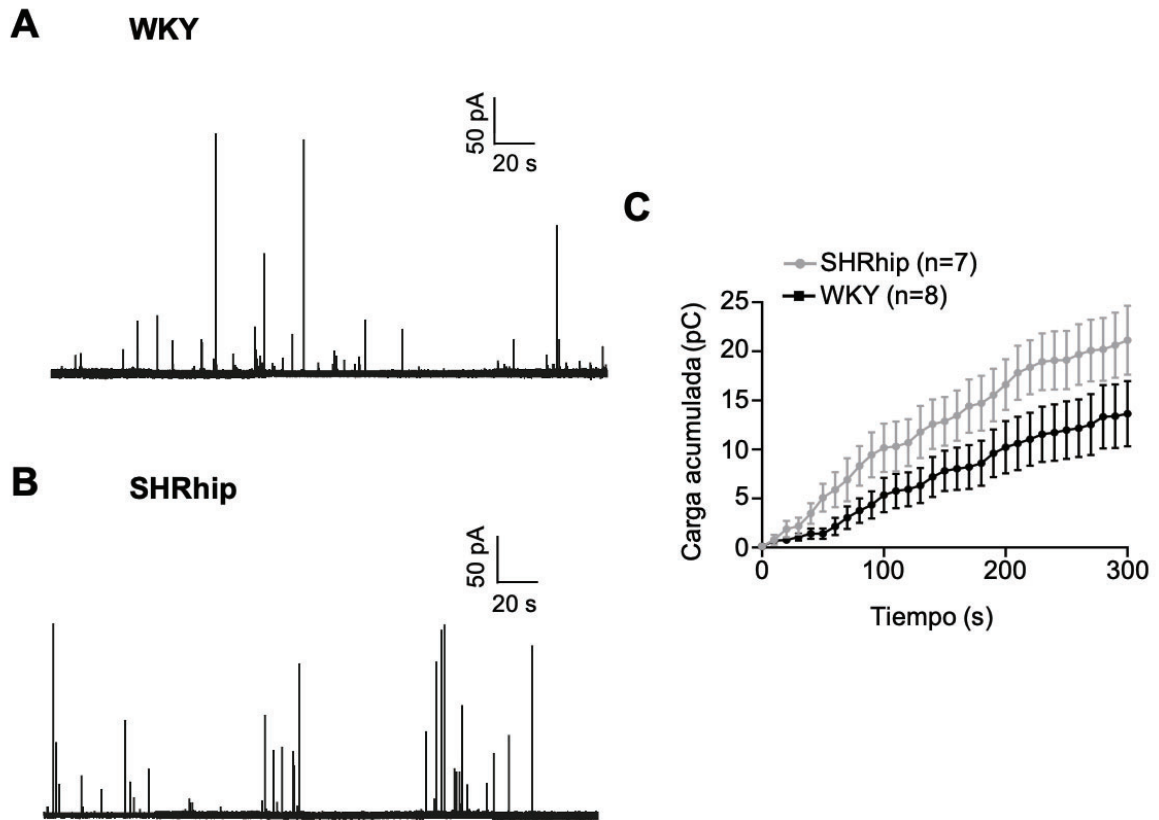
De las CCs de ratas WKY —con 12 semanas— el 80% presentaron liberación espontánea, mientras que en las CCs de ratas SHRhip fue el 77.7%. La Fig. 8A-B presenta trazos representativos de los registros amperométricos en CCs de ratas SHRhip y WKY de 12 semanas en condiciones basales. La carga acumulada después de 5 minutos de registro de las CCs de ratas SHRhip fue mayor que en las CCs de WKY de la misma edad ( $21.1 \pm 3.5$  pC vs  $14.2 \pm 3.5$  pC); al igual que en las

ratas SHRpre la carga acumulada fue mayor pero no significativamente distinta al comparar con las CCs de ratas WKY de la misma edad (Fig. 8C).

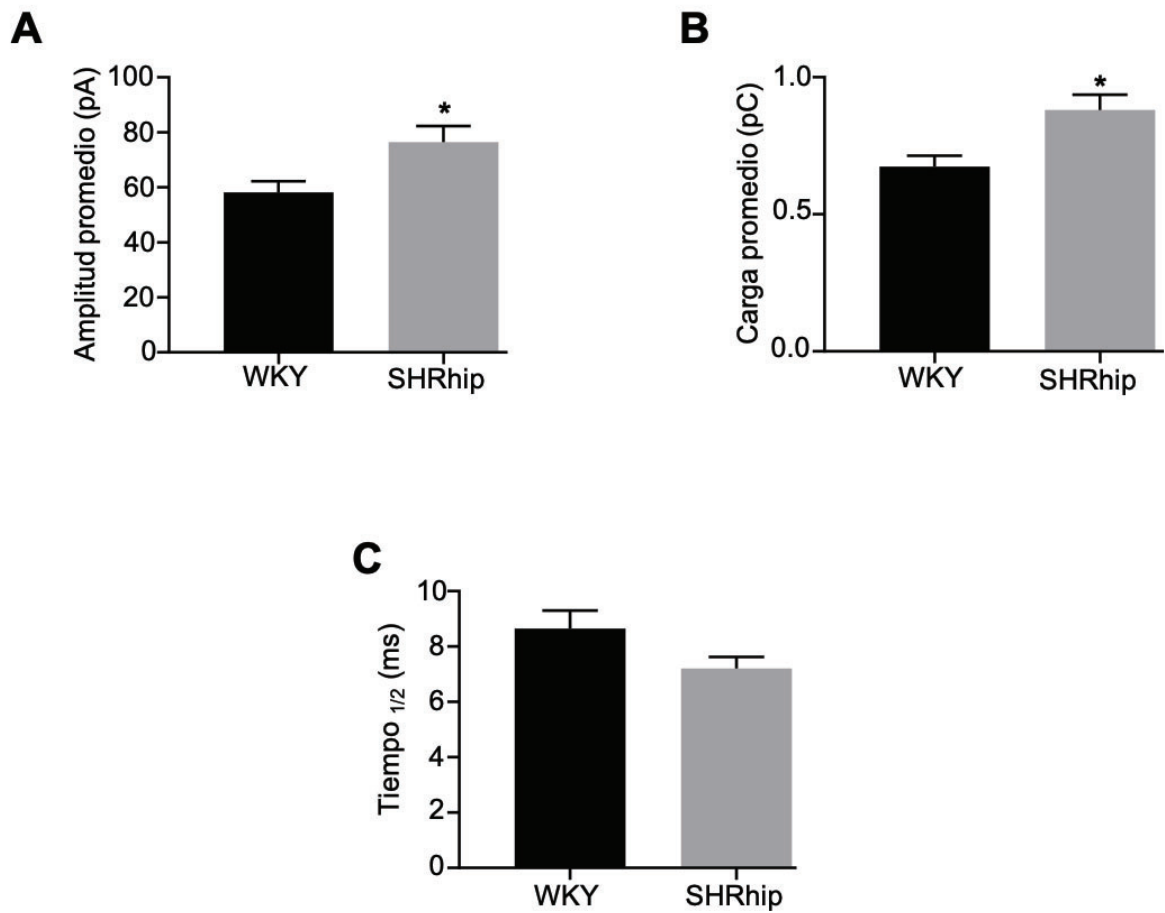
Al evaluar los parámetros cinéticos, dos de ellos mostraron diferencias significativas. La amplitud máxima de las espigas ( $I_{max}$ ),  $76.4 \pm 5.8$  pA vs  $58.1 \pm 4.1$  pA,  $p=0.01$  y la carga por espiga fueron mayores en las CCs de ratas SHRhip,  $0.88 \pm 0.05$  vs  $0.67 \pm 0.04$ ,  $p=0.003$ , (Fig. 9A y B). En la Fig. 10B se muestra el histograma de la distribución de las amplitudes de las espigas en ambas cepas. En las CCs de ratas SHRhip se observó un mayor número de espigas grandes (190-290 pA) y medianas (50-190 pA), 9% y 43.5% respectivamente, mientras que en las CCs de ratas WKY fue de 6.8% y 36.9%. Por otra parte, en las CCs de ratas WKY presentaron un mayor número de espigas pequeñas, 56.3% vs 47.5% en las CCs de ratas SHRhip (Tabla 3).

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de espigas amperométricas generadas espontáneamente en condiciones basales de CCs de SHRpre y SHRhip, así como su control normotenso WKY.

	<b>Carga acumulada (pC)</b>	<b>Carga por espiga (pC)</b>	<b><math>I_{max}</math> (pA)</b>	<b><math>t_{1/2}</math> (ms)</b>	<b>No. espigas</b>
<b>WKY</b> (4-5 sem) n=13	$15.1 \pm 3.2$	$0.70 \pm 0.06$	$43.8 \pm 3.1$	$10.4 \pm 0.7$	$13.4 \pm 1.6$
<b>SHRpre</b> (4-5 sem) n=21	$23.5 \pm 4.5$	$1.08 \pm 0.05^*$	$51.7 \pm 2.9$	$11.6 \pm 0.4$	$17.6 \pm 2.6$
<b>WKY</b> (12 sem) n=8	$14.2 \pm 3.5$	$0.67 \pm 0.04$	$58.1 \pm 4.1$	$8.6 \pm 0.6$	$21.0 \pm 4.7$
<b>SHRhip</b> (12 sem) n=7	$21.1 \pm 3.5$	$0.88 \pm 0.05^*$	$76.4 \pm 5.8^*$	$7.2 \pm 0.4$	$24.4 \pm 5.6$

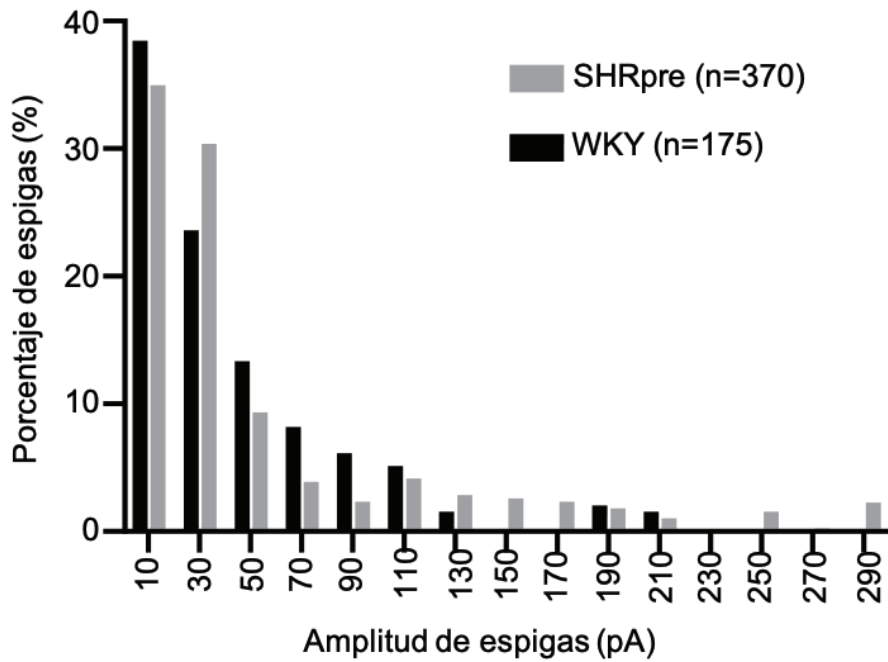
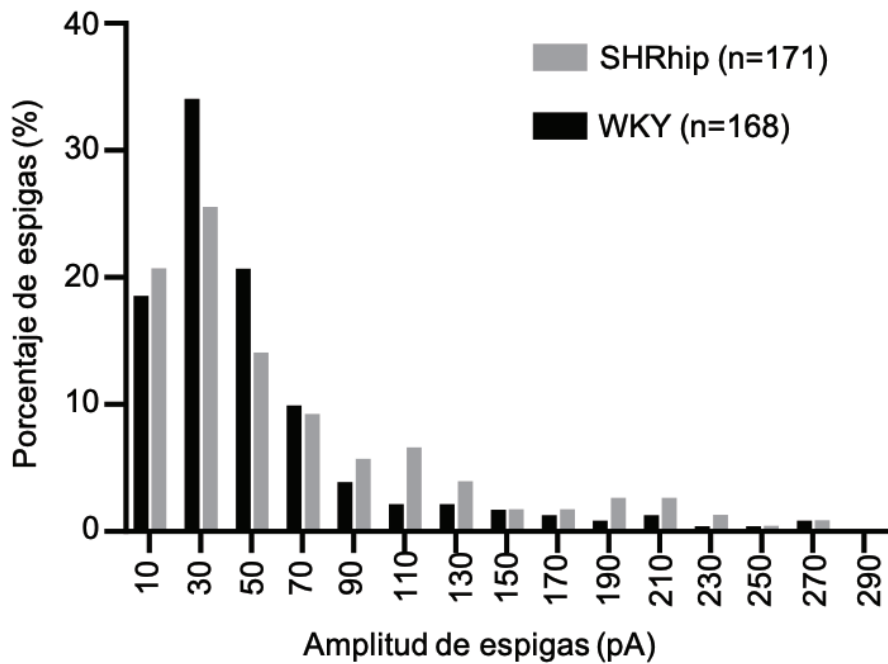


**Figura 8.** Liberación de CA en CCs de ratas SHRhip y WKY de 12 semanas en condiciones basales. A-B) Trazos representativos de la liberación de CA en CCs de ratas WKY de 12 semanas (A) y de SHRhip (B). C) Carga acumulada de las espigas amperométricas de CCs de ratas WKY de 12 semanas (círculos negros) y de SHRhip (círculos grises). Cada punto representa la media  $\pm$  ESM, n representa el número de CCs registradas.



**Figura 9.** Gráficas de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en CCs de WKY de 12 semanas (n=171) y SHRhip (n=168) en condiciones basales. A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo $_{1/2}$ . Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM, \* $p < 0.05$ .



**A****B**

**Figura 10.** Histogramas de distribución de la amplitud de las espigas amperométricas durante la liberación espontánea de CA en SHRpre, SHRhip y sus respectivos controles WKY de la misma edad. A) Porcentaje de espigas de CCs de SHRpre y WKY de 4-5 semanas. B) Porcentaje de espigas de CCs de SHRhip y WKY de 12 semanas.

**Tabla 3.** Porcentaje de espigas amperométricas espontáneas en condiciones basales: pequeñas (0-50 pA), medianas (50-190 pA) y grandes (190-290 pA) en CCs de ratas SHRpre y SHR hip, con sus respectivos controles WKY.

<b>Espigas</b>	<b>Pequeñas (%)</b>	<b>Medianas %</b>	<b>Grandes %</b>
<b>WKY</b> (4-5 sem) n= 175	62.0	34.3	3.7
<b>SHRpre</b> (4-5 sem) n=370	65.4	27.4	7.2
<b>WKY</b> (12 sem) n= 168	56.3	36.9	6.8
<b>SHRhip</b> (12 sem) n= 171	47.5	43.5	9.0

#### **4. Secreción de catecolaminas luego de una despolarización con K<sup>+</sup> 60 mM en CCs de ratas SHR prehipertensas y WKY de la misma edad.**

Para evaluar el efecto de la despolarización —que produce la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de los CCDV (Carbone et al., 2019)— se aplicó un pulso de 5 segundos de K<sup>+</sup> 60 mM, después de que la célula había sido registrada (por 5 minutos) de manera basal. En la Fig. 11 A-B, se observan los trazos representativos de la liberación de CA obtenidos de ambas cepas. Después de aplicar el pulso de K<sup>+</sup> las CCs empezaron a liberar CA con un retraso de  $1.4 \pm 0.18$  s en las ratas SHRpre y de  $1.1 \pm 0.23$  s en las ratas WKY de la misma edad ( $p=0.75$ ), se observó una ráfaga de liberación con una duración de  $\sim 38$  s en SHRpre y mayor número de espigas ( $57.8 \pm 7.8$ ), mientras que en las CCs de WKY tuvo una duración de  $\sim 20$  s y el número de espigas fue menor ( $33.0 \pm 4.8$ ,  $p=0.03$ ) (Tabla 4).

En la Fig. 11C se muestra la carga acumulada con 2 segundos de intervalo. Después de 60 seg la carga acumulada fue  $\sim 3$  veces ( $p= 0.0009$ ) mayor en las CCs de SHRpre ( $61.8 \pm 2.7$  pC) en comparación con las CCs de WKY ( $21.3 \pm 2.3$  pC). Además, el número de espigas fue mayor ( $p=0.03$ ) en las CCs SHRpre ( $57.8 \pm 7.8$ ) en comparación con las CCs de WKY ( $33.0 \pm 4.8$ ).

Los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas también arrojaron diferencias significativas (Figura 12). El valor promedio de la amplitud máxima ( $I_{max}$ ) fue significativamente mayor ( $p < 0.0001$ ) en las CCs de SHRpre ( $66.8 \pm 2.9$  pA) que en las CCs de WKY ( $46.2 \pm 2.1$  pA) Fig. 12A. También la carga por espiga fue mayor ( $p < 0.0001$ ),  $0.97 \pm 0.02$  pC en las CCs de SHRpre vs  $0.68 \pm 0.06$  pC en las CCs de WKY, Fig. 12B. Por otra parte, el tiempo medio fue menor ( $p < 0.0001$ ) en las CCs de WKY ( $9.7 \pm 0.3$  ms) que en las CCs de SHRpre ( $11.6 \pm 0.2$  ms; Fig. 12C), lo cual indica que en base a la amplitud promedio y la carga por espiga, las CCs de SHRpre liberan mayor cantidad de CA, pero la liberación de CA es más lenta en las CCs de SHRpre, los valores se muestran en la Tabla 4.

El histograma de la distribución de la amplitud máxima de las espigas amperométricas —que se muestra en la Fig. 16A—, reveló una mayor cantidad de espigas grandes (190-290 pA) y medianas (50-190 pA) en las CCs de SHRpre (7% y 35.8%, respectivamente) al comparar con CCs de WKY (3.5% y 32.2%, respectivamente; Tabla 6). Estos resultados sugieren gránulos de secreción con mayor contenido de CA, los cuales no se observan en las CCs de WKY.

Además de los resultados anteriormente mostrados, observamos que las CCs de ratas SHRpre mostraron una mayor variabilidad en los registros amperométricos de liberación de CA (Tabla 4). Esto nos hizo pensar que posiblemente existían subgrupos. Para resolver esto, dividimos los registros obtenidos de CCs de SHRpre en tres diferentes subgrupos (Fig. 11D) en base a su carga acumulada en comparación con CCs de WKY ( $21.3 \pm 2.3$  pC):

- **Subgrupo 1:** La carga acumulada fue de  $23.69 \pm 1.5$  pC ( $p=0.99$ ) y también los parámetros cinéticos fueron similares a las CCs de WKY,  $I_{max}$ :  $48.3 \pm 2.7$  pA vs  $46.2 \pm 2.1$  pA ( $p=0.99$ ), Carga:  $0.73 \pm 0.03$  pC vs  $0.68 \pm 0.06$  pC ( $p=0.93$ ) y  $t_{1/2}$ :  $10.1 \pm 0.4$  ms vs  $9.7 \pm 0.3$  ms ( $p=0.76$ ), CCs de SHRpre y de WKY, respectivamente. Estos resultados muestran que las CCs del subgrupo 1 liberan cantidades similares de CA que las CCs de WKY y con la misma

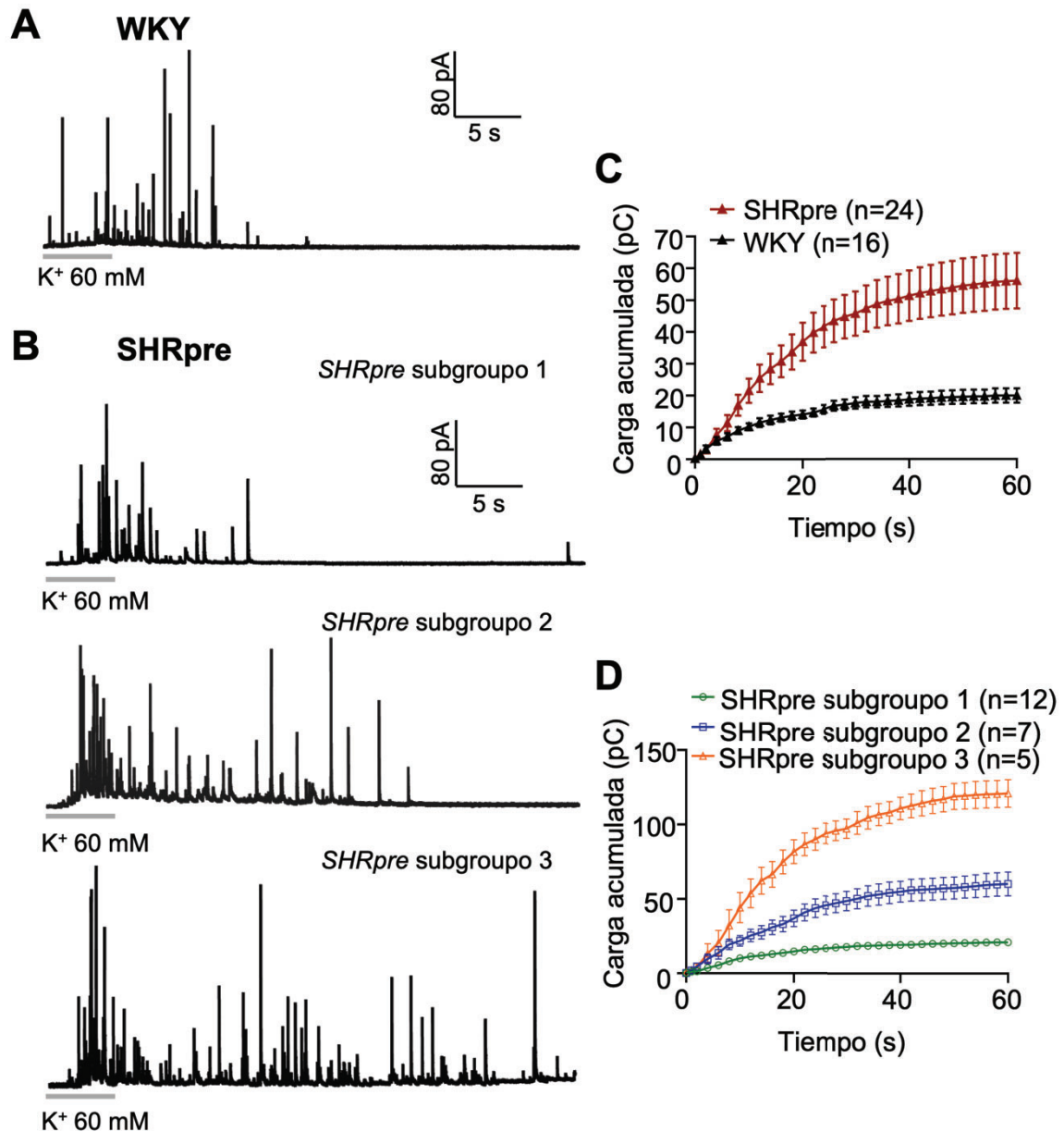
velocidad. El tiempo desde la aplicación del estímulo de K<sup>+</sup> en las CCs al momento de aparecer las espigas fue mayor en el subgrupo 1 ( $1.5 \pm 0.30$  s) que en las CCs de WKY ( $1.1 \pm 0.23$  s), pero la diferencia no es significativa ( $p=0.54$ ).

- **Subgrupo 2:** La carga acumulada fue aproximadamente tres veces mayor que en las ratas WKY,  $71.7 \pm 9.0$  pC ( $p=0.001$ ). Por otro lado, los parámetros cinéticos también fueron mayores, pero solo la carga y el tiempo medio fueron significativamente diferentes,  $I_{\max}$ :  $51.4 \pm 2.3$  pA vs  $46.2 \pm 2.1$  pA ( $p=0.78$ ), Carga:  $0.86 \pm 0.03$  pC vs  $0.68 \pm 0.06$  pC ( $p=0.04$ ) y  $t_{1/2}$ :  $11.9 \pm 0.2$  ms vs  $9.7 \pm 0.3$  ms ( $p<0.0001$ ), CCs de SHRpre y de WKY, respectivamente. El tiempo que tarda en comenzar la secreción en las CCs del *subgrupo 2* después del estímulo ( $1.2 \pm 0.18$  s), fue muy similar ( $p=0.99$ ) que en las CCs de WKY ( $1.1 \pm 0.23$  s).
- **Subgrupo 3:** La carga acumulada fue aproximadamente seis veces mayor en comparación con las CCs de WKY,  $127 \pm 10.1$  pC ( $p<0.0001$ ). Los parámetros cinéticos también fueron significativamente mayores,  $I_{\max}$ :  $110.7 \pm 8.8$  pA vs  $46.2 \pm 2.1$  pA ( $p<0.0001$ ), Carga por espiga:  $1.28 \pm 0.06$  pC vs  $0.68 \pm 0.06$  pC ( $p<0.0001$ ) y  $t_{1/2}$ :  $12.5 \pm 0.4$  ms vs  $9.7 \pm 0.3$  ms ( $p<0.0001$ ), CCs de SHRpre y de WKY, respectivamente. El tiempo que tarda en comenzar la secreción en las CCs del *subgrupo 3* después del estímulo ( $1.3 \pm 0.31$  s), fue mayor que en las CCs de WKY ( $1.1 \pm 0.23$  s), pero no de manera significativa ( $p=0.98$ ).

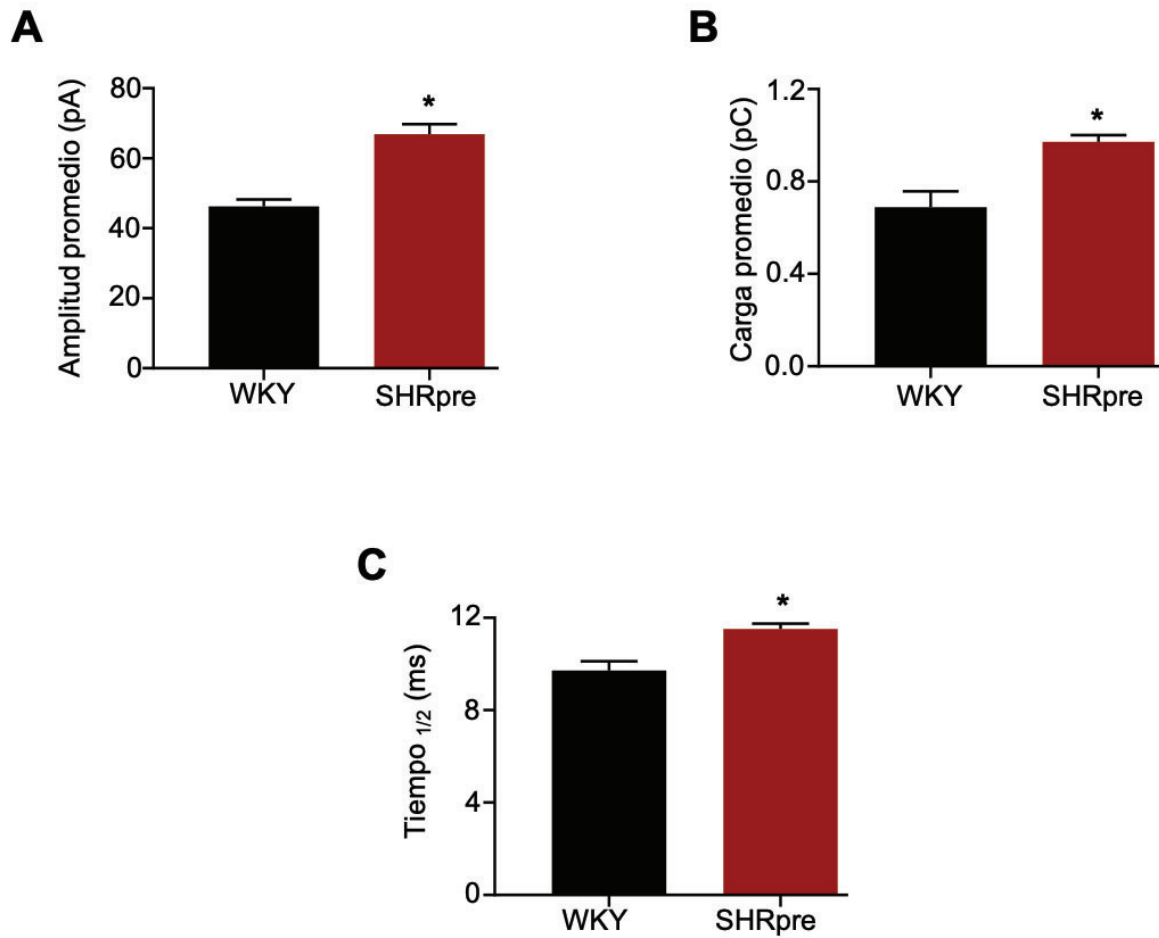
Nuestros resultados indican que la secreción de CA en CCs de SHRpre en el subgrupo 1 no presenta diferencias significativas en comparación con las CCs de WKY de la misma edad. Sin embargo, el subgrupo 2 y subgrupo 3, presentan hipersecreción de CA.

**Tabla 4.** Parámetros cinéticos de espigas amperométricas después de la despolarización con un pulso de alto K<sup>+</sup> en CCs de SHRpre y control normotenso WKY.

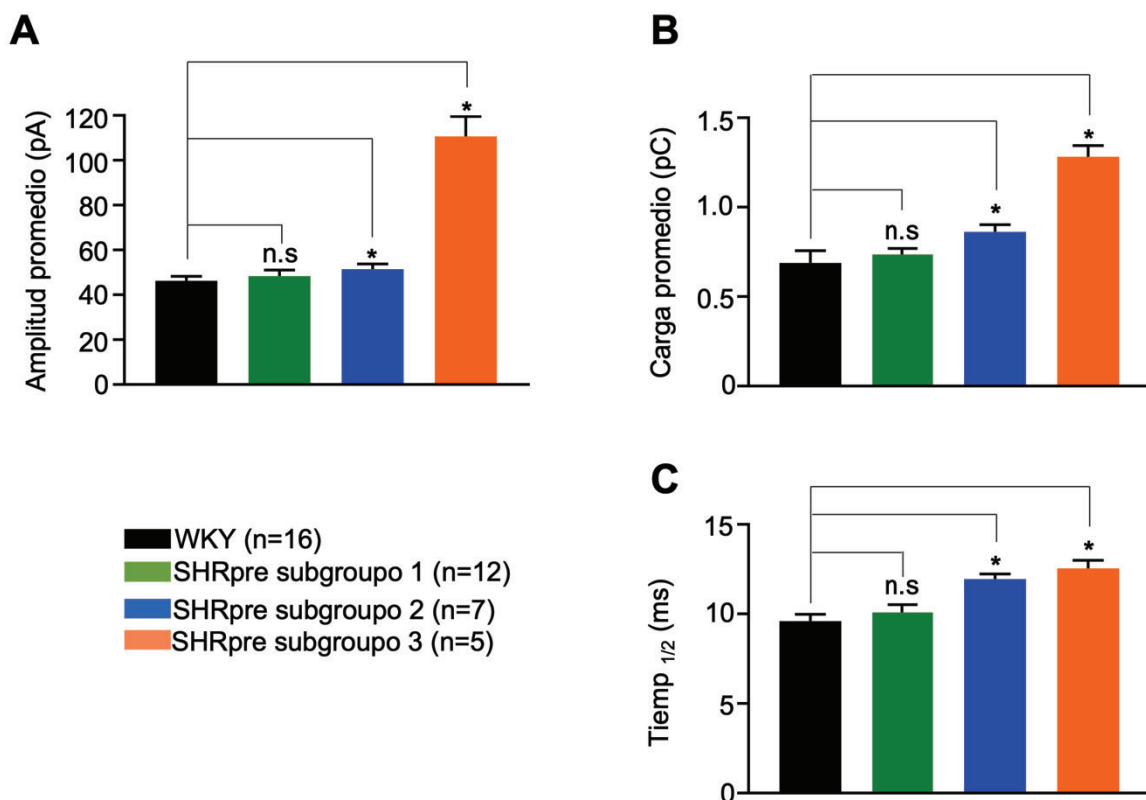
	<b>Carga acumulada (pC)</b>	<b>Carga por espiga (pC)</b>	<b>I<sub>max</sub> (pA)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (ms)</b>	<b>No. espigas</b>
<b>WKY</b> (4-5sem) n= 16	21.3 ± 2.3	0.68 ± 0.06	46.2 ± 2.1	9.7 ± 0.3	33.0 ± 4.8
<b>SHRpre</b> (4-5sem) n= 24	61.8 ± 8.8*	0.97 ± 0.02*	66.8 ± 2.9*	11.6 ± 0.2*	57.8 ± 7.8*
<b>Subgrupo 1</b> (n=12)	23.7 ± 1.5	0.73 ± 0.03	43.8 ± 2.7	10.1 ± 0.4	32.5 ± 4.2
<b>Subgrupo 2</b> (n=7)	71.7 ± 9.0*	0.86 ± 0.03*	51.4 ± 2.3	11.9 ± 0.2*	69.2 ± 15.7*
<b>Subgrupo 3</b> (n=5)	127.3 ± 10.1*	1.28 ± 0.06*	110.7 ± 8.8*	12.5 ± 0.4*	105.2 ± 10.1*



**Figura 11.** Liberación de catecolaminas después de la despolarización con un pulso de alto K<sup>+</sup> (60 mM) en CCs de ratas SHRpre y WKY de 4-5 semanas. A-B) Trazos representativos de la liberación de CA en CCs de ratas WKY de 4-5 semanas (A) y de SHRpre (B). C) Carga acumulada de las espigas amperométricas de CCs de ratas WKY de 4-5 semanas (triángulos negros) y de SHRpre (triángulos rojos). D) Subgrupos de secreción de CA en SHRpre (Subgrupo 1; círculos verdes, Subgrupo 2; cuadros azules; Subgrupo 3: triángulos anaranjados). Cada punto representa la media ± ESM, n representa el número de CCs registradas.



**Figura 12.** Gráficas de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en CCs de WKY de 4-5 semanas (n=528) y SHRpre (n=1387) después de la aplicación de un pulso de alto K<sup>+</sup> para despolarizar las CCs. A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo<sub>1/2</sub>. Cada una de las gráficas representa la media ± ESM, \**p*<0.05.



**Figura 13.** Gráficas de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en CCs de WKY de 4-5 semanas y los subgrupos de SHRpre después de la despolarización con un pulso de alto  $K^+$ . A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo $_{1/2}$ . Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM, \* $p < 0.05$ , respecto a WKY.

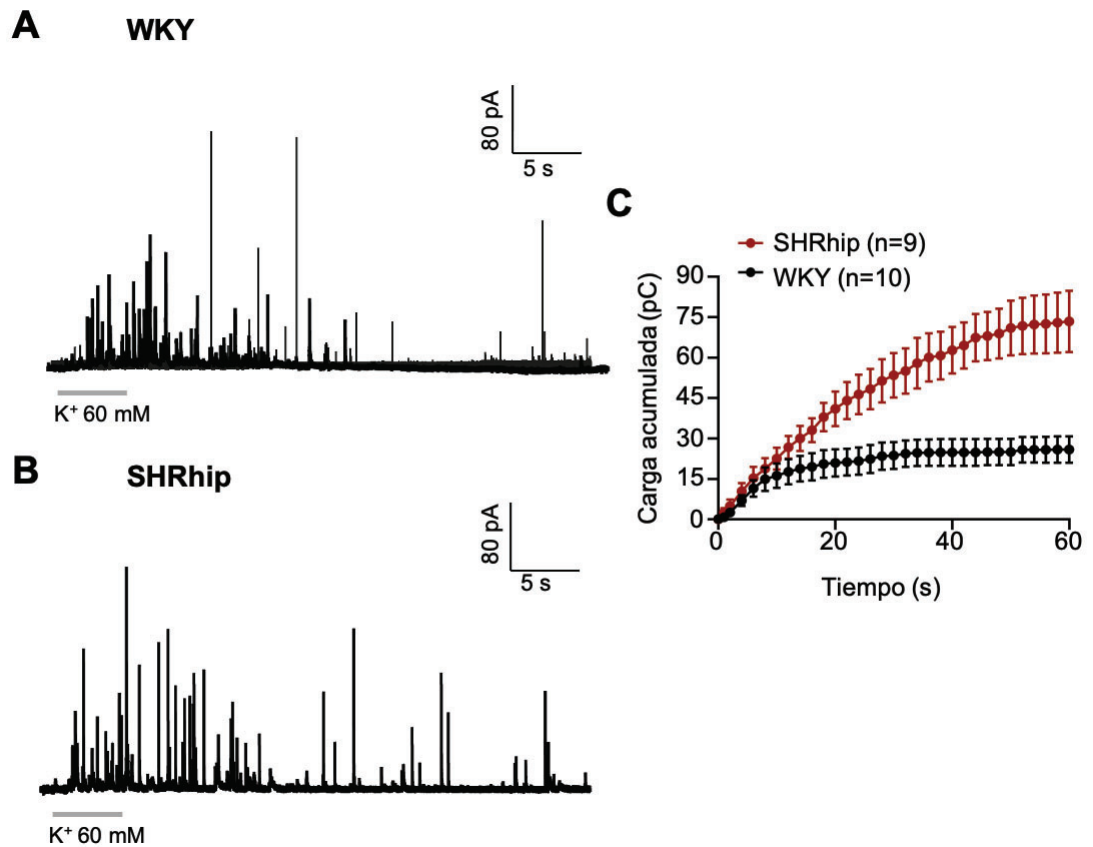
## 5. Secreción de catecolaminas tras una despolarización con $K^+$ 60 mM en las CCs de las ratas SHR hipertensas y WKY de la misma edad.

En la Fig. 14A-B se muestran los registros representativos obtenidos tras la despolarización —con un pulso de  $K^+$  60 mM— en CC de ratas WKY y SHR hipertensas. La ráfaga de secreción tuvo una duración de  $\sim 35$  s en SHRhip —con un número de espigas mayor ( $57.7 \pm 6.2$ ,  $p=0.03$ )— y de  $\sim 20$  s en WKY —menor número de espigas ( $29.1 \pm 5.8$ )—. Después de 60 segundos de liberación, la carga acumulada fue casi 3 veces mayor ( $p=0.0008$ ) en las CCs de ratas SHRhip ( $71.7 \pm 10.3$  pC) comparadas con las CCs de WKY ( $25.9 \pm 4.8$  pC) (Tabla 5, Fig. 14C).

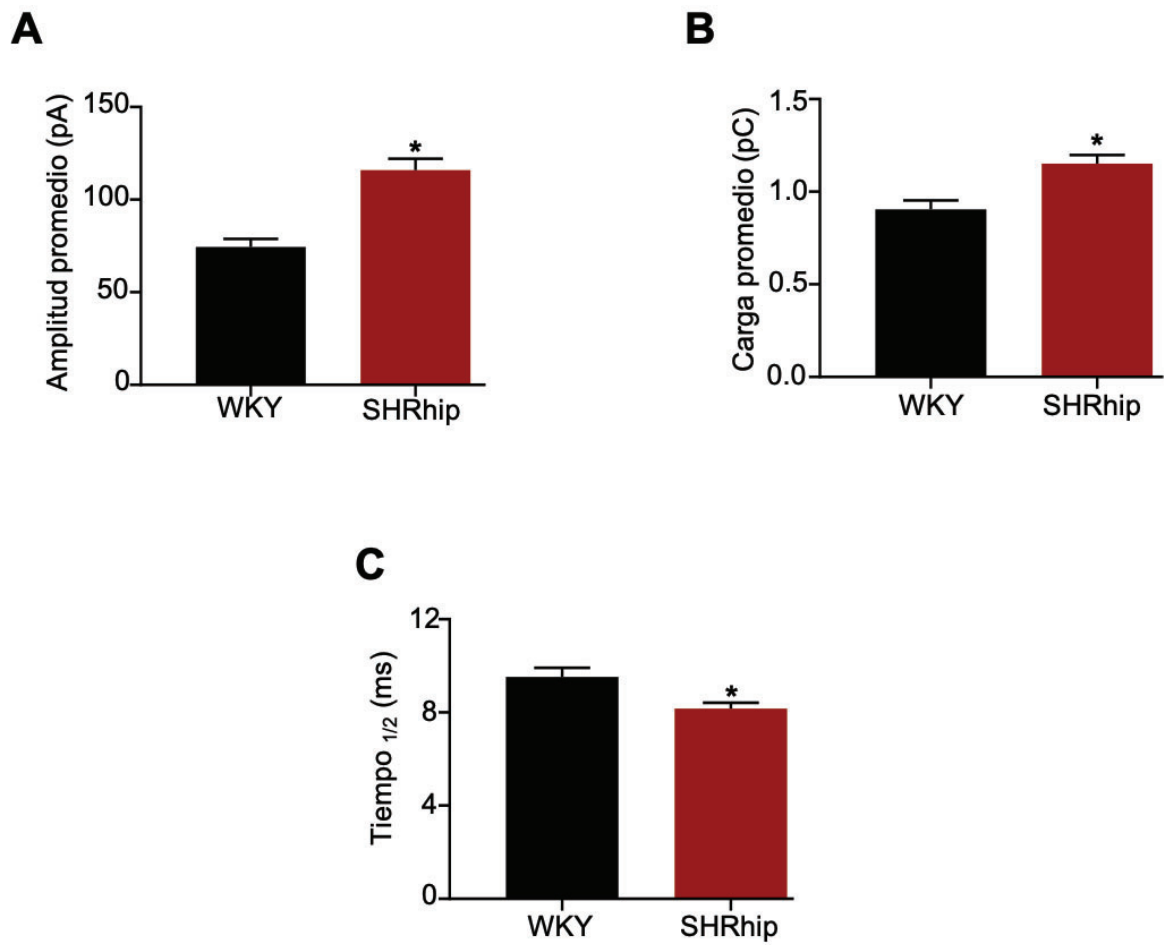


Igualmente, los parámetros cinéticos (Fig. 15A-C), incluidos la amplitud promedio ( $p < 0.0001$ ),  $115.9 \pm 6.1$  pA y la carga por espiga ( $p = 0.001$ ),  $1.2 \pm 0.04$  pC, fueron mayores en las CCs de SHRhip, en comparación con las CCs de WKY,  $74.4 \pm 4.7$  pA y  $0.91 \pm 0.04$ . Los resultados nos indican una hipersecreción de CA en las SHRhip, resultados similares fueron publicados por (Segura-Chama et al., 2015). El tiempo medio fue significativamente menor ( $p = 0.003$ ) en las CCs de SHRhip ( $8.1 \pm 0.2$  ms) en comparación con WKY ( $9.5 \pm 0.3$ ), lo que quiere decir que la liberación de CA por las CCs de SHRhip es más rápida que en WKY. Los resultados antes descritos se pueden observar en la Tabla 5.

En el histograma de frecuencia de la amplitud de las espigas amperométricas, en la Fig. 16B, se observa un mayor número de espigas grandes (16.5%) en las CCs de SHRhip que en las de WKY (7.4%). Los resultados del porcentaje de espigas en los diferentes tamaños se observan en la Tabla 6.



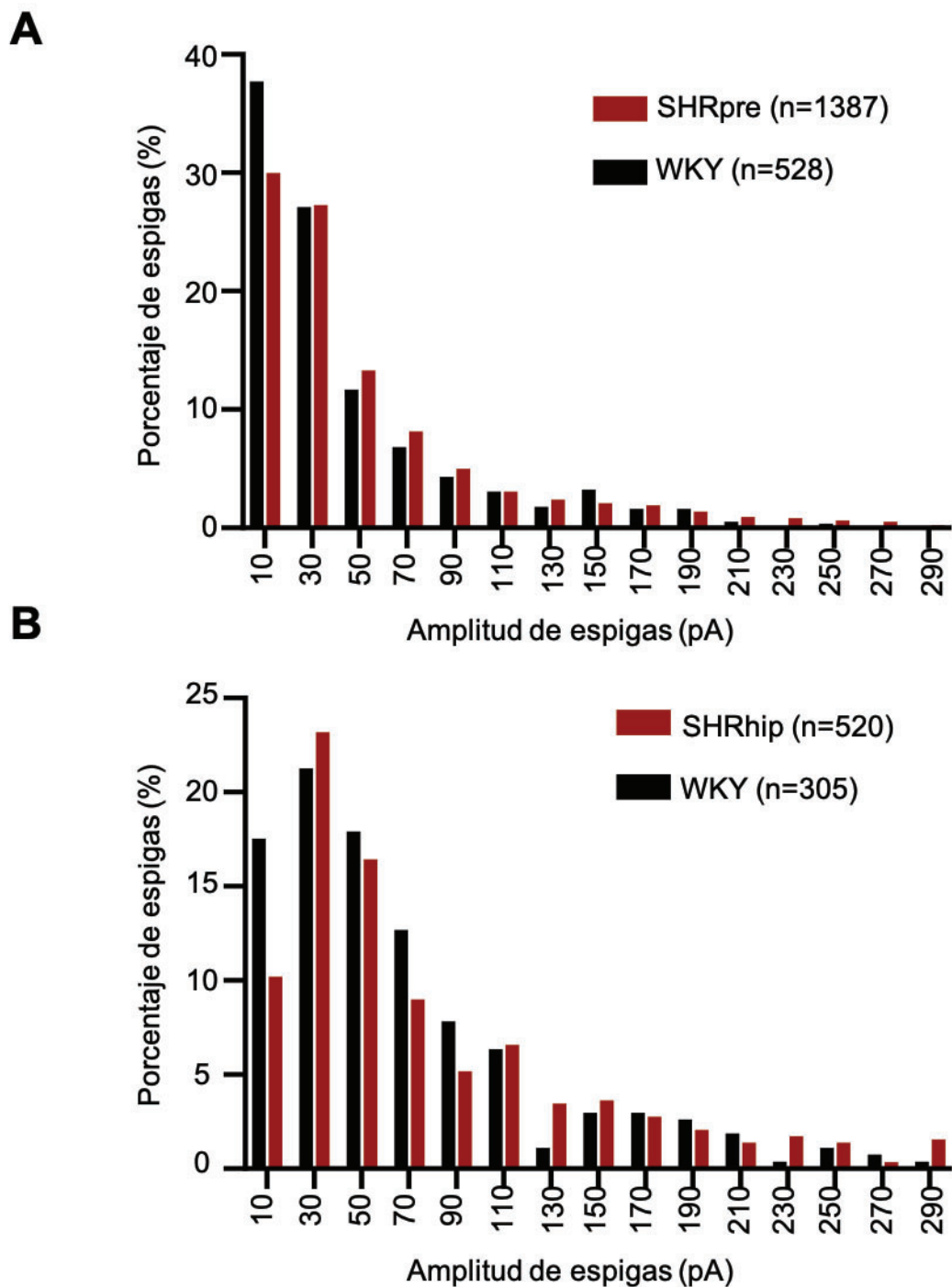
**Figura 14.** Liberación de catecolaminas después de la despolarización con un pulso de alto K<sup>+</sup> (60 mM) en CCs de ratas SHRhip y WKY de 12 semanas. A-B) Trazos representativos de la liberación de CA en CCs de ratas WKY de 12 semanas (A) y de SHRhip (B). C) Carga acumulada de las espigas amperométricas de CCs de ratas WKY de 12 semanas (círculos negros) y de SHRhip (círculos rojos). Cada punto representa la media  $\pm$  ESM, n representa el número de CCs registradas.



**Figura 15.** Gráficas de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en CCs de WKY de 12 semanas (n=305) y SHRhip (n=520) después de la aplicación de un pulso de alto  $K^+$  (60 mM) para despolarizar la célula. A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo  $_{1/2}$ . Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM, \* $p < 0.05$ .

**Tabla 5.** Parámetros cinéticos de espigas amperométricas en CCs, tras la despolarización con  $K^+$  60 mM de SHRhip y su control normotenso WKY de la misma edad.

	<b>Carga acumulada (pC)</b>	<b>Carga por espiga (pC)</b>	<b>I<sub>max</sub> (pA)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (ms)</b>	<b>No. espigas</b>
<b>WKY</b> (12 sem) n= 10	25.9 ± 4.8	0.91 ± 0.04	74.4 ± 4.7	9.5 ± 0.3	29.1 ± 5.8
<b>SHRhip</b> (12 sem) n= 9	71.7 ± 10.3*	1.2 ± 0.04*	115.9 ± 6.1*	8.1 ± 0.2*	57.7 ± 6.2*



**Figura 16.** Histogramas de distribución de la amplitud de las espigas amperométricas por la despolarización con  $K^+$  en SHRpre, SHRhip y sus respectivos controles WKY de la misma edad. A) Porcentaje de espigas de CCs de SHRpre y WKY de 4-5 semanas. B) Porcentaje de espigas de CCs de SHRhip y WKY de 12 semanas.

**Tabla 6.** Porcentaje de espigas amperométricas tras la despolarización con  $K^+$  60 mM: pequeñas (0-50 pA), medianas (50-190 pA) y grandes (190-290 pA) en CCs de ratas SHRpre y SHR hip, con sus respectivos controles WKY de la misma edad.

<b>Espigas</b>	<b>Pequeñas (%)</b>	<b>Medianas (%)</b>	<b>Grandes (%)</b>
<b>WKY</b> (4-5 sem) n=528	64.3	32.2	3.5
<b>SHRpre</b> (4-5 sem) n=1387	57.2	35.8	7.0
<b>WKY</b> (12 sem) n=291	38.8	53.8	7.4
<b>SHRhip</b> (12 sem) n=529	33.4	50.1	16.5

## 6. Secreción de catecolaminas luego de la estimulación con cafeína en CCs de SHR prehipertensas y WKY de la misma edad.

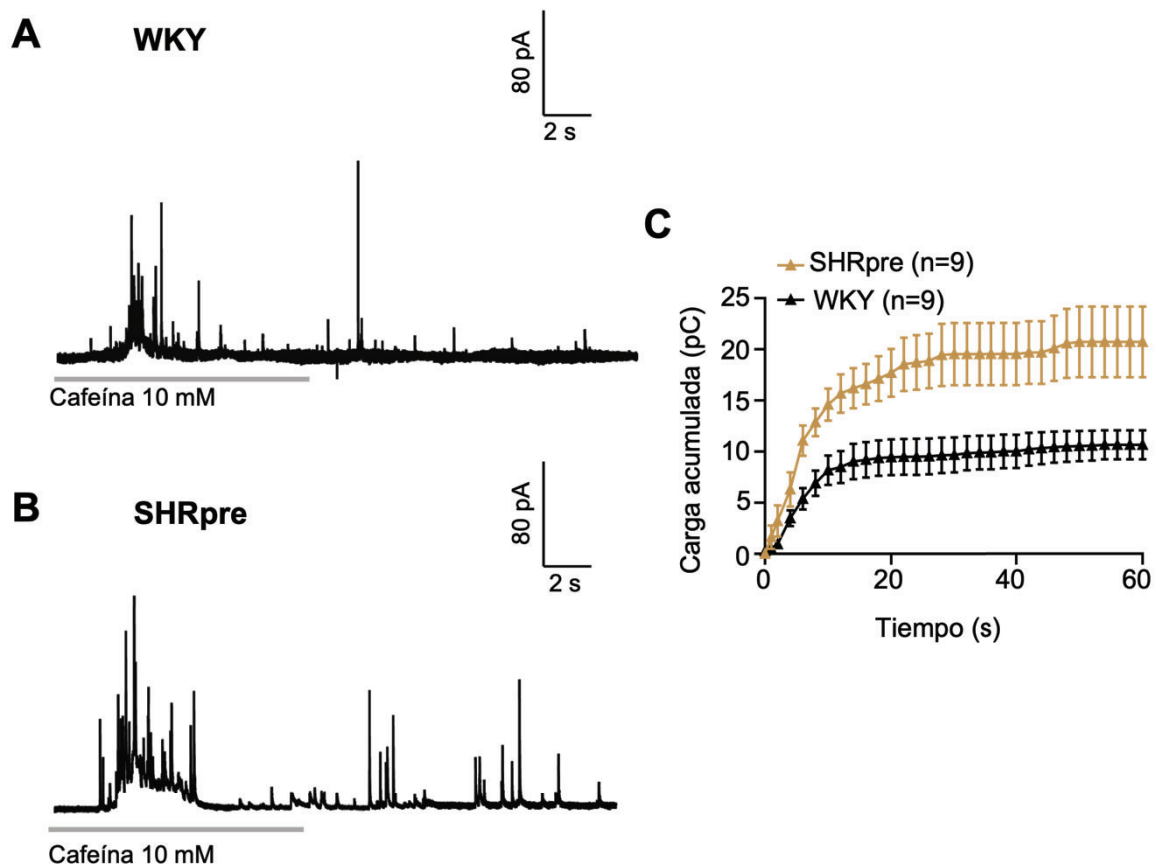
Con el fin de evaluar la influencia de la liberación de  $Ca^{2+}$  en las pozas intracelulares —particularmente del retículo endoplásmico—, mediante la activación de los RyR (Hernández-Cruz et al. 1995; Malgaroli, Fesce, y Meldolesi 1990) y después del registro de la secreción espontánea, se aplicó un pulso de 10 s de cafeína 10 mM. La figura 17A-B, muestra los trazos representativos de la liberación de CA tras el estímulo de cafeína.

A diferencia de la respuesta a la despolarización con  $K^+$ , que se presenta rápidamente ( $1.4 \pm 0.18$  s en SHRpre y  $1.1 \pm 0.23$  s en WKY), las reacciones a cafeína (de las CCs) presentaron un retraso en la liberación de CA,  $3.4 \pm 0.65$  s en SHRpre y  $3.2 \pm 0.65$  s en WKY. Además, los registros mostraron una ráfaga de espigas, además de una elevación en la línea basal y tuvieron una duración de alrededor de 10 segundos en ambas cepas. La carga acumulada después de 60 s de liberación fue de casi el doble ( $p=0.01$ ) en las CCs de SHRpre ( $20.3 \pm 3.6$  pC) que en las CCs de WKY ( $10.8 \pm 1.5$  pC) (Tabla 7).

Los valores de la amplitud promedio por espiga,  $46.9 \pm 2.7$  pA —en las CCs de SHRpre—, fue mayor ( $p=0.04$ ) que en las CCs de WKY,  $39.5 \pm 2.4$  pA, al igual que la carga promedio por espiga ( $p=0.012$ ),  $0.68 \pm 0.04$  pC y  $0.51 \pm 0.03$  pC, CCs de SHRpre y WKY, respectivamente. El tiempo medio también fue mayor ( $p<0.0001$ ) en SHRpre,  $10.5 \pm 0.4$  ms, en comparación con  $7.6 \pm 0.4$  ms en las CCs de WKY. Estos resultados se resumen en la Fig. 18A-C y en la Tabla 7.

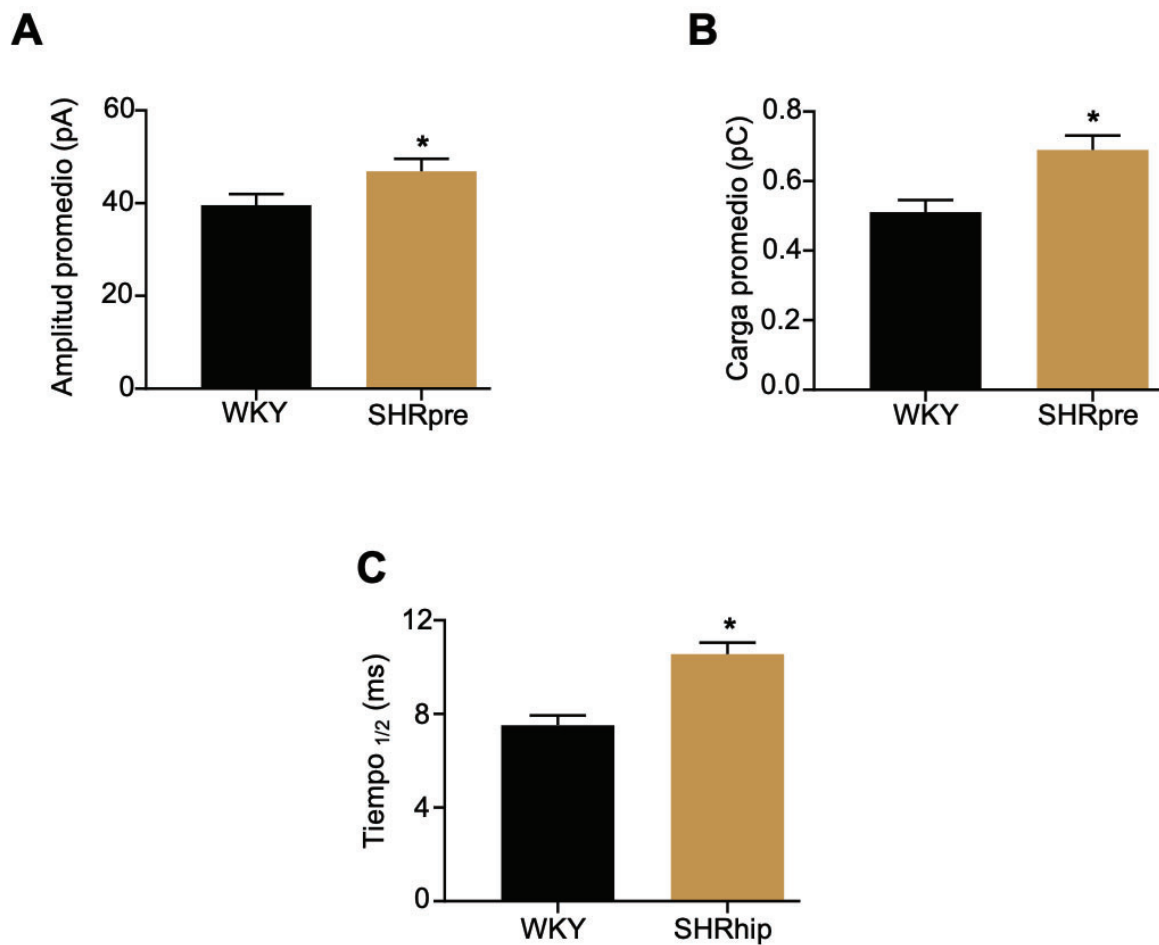
En el histograma de frecuencia de la amplitud de espigas —que se muestra en la figura 19A—, se puede observar un mayor número de espigas de tamaño grande (190-290 pA) y medianas (50-190 pA), en las CCs de SHRpre. Por otro lado, en las CCs de WKY se observa un mayor número de espigas pequeñas (0-50 pA; Tabla 8). Además, el número de espigas fue mayor en las CCs de SHRpre ( $28.3 \pm 4.8$ ) que en las de WKY ( $20.8 \pm 2.1$ ), pero la diferencia no es significativa.

Estos resultados sugieren que, en la secreción de CA de las CCs de las SHRpre, hay una mayor contribución de la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular por medio del mecanismo de liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por  $Ca^{2+}$  (CICR) en comparación con las CCs de las ratas WKY.



**Figura 17.** Liberación de catecolaminas generada por la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares, producido por un pulso de cafeína 10 mM en CCs de ratas SHRpre y WKY de 4-5 semanas. A-B) Trazos representativos de la liberación de CA en CCs de ratas WKY de 4-5 semanas (A) y de SHRpre (B). C) Carga acumulada de las espigas amperométricas de CCs de ratas WKY de 4-5 semanas (triángulos negros) y de SHRpre (triángulos amarillos). Cada punto representa la media  $\pm$  ESM, n representa el número de CCs registradas.





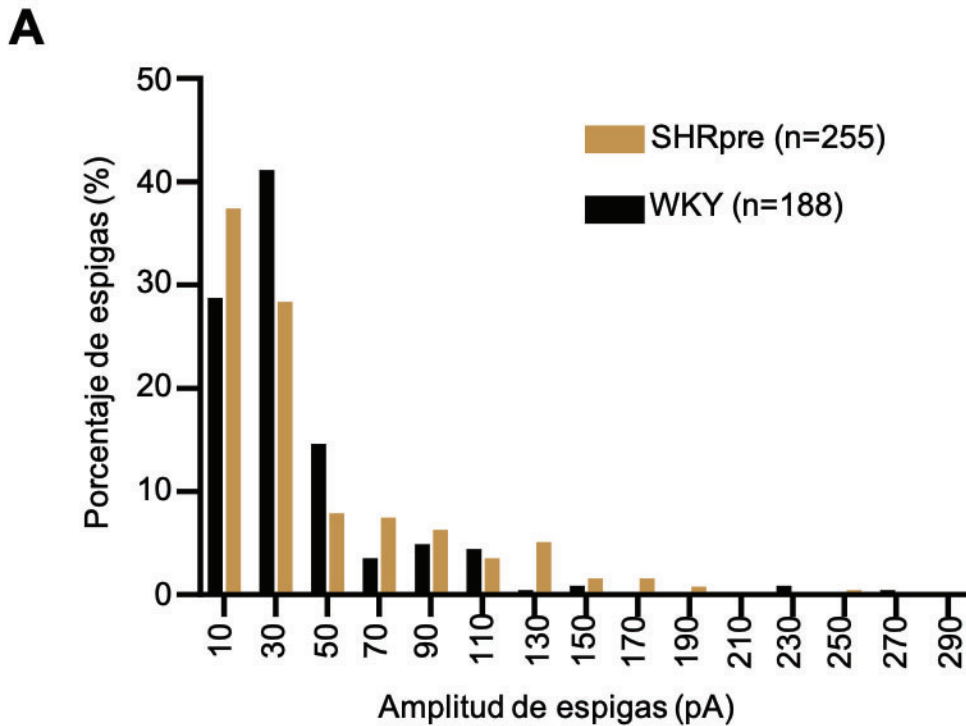
**Figura 18.** Gráficas de los parámetros cinéticos —de las espigas amperométricas— en CCs de WKY de 4-5 semanas (n=188) y SHRpre (n=255), después de la aplicación de un pulso de cafeína para generar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de pozas intracelulares. A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo $_{1/2}$ . Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM, \* $p < 0.05$ .

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos de espigas amperométricas de las CCs en ratas SHRpre y su control normotenso WKY —de la misma edad —, después de estimular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con cafeína.

	<b>Carga acumulada (pC)</b>	<b>Carga por espiga (pC)</b>	<b>I<sub>max</sub> (pA)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (ms)</b>	<b>No. espigas</b>
<b>WKY</b> (4-5 sem) n=9	10.8 ± 1.5	0.51 ± 0.03	39.5 ± 2.4	7.6 ± 0.4	20.8 ± 2.1
<b>SHRpre</b> (4-5 sem) n=9	20.3 ± 3.6*	0.68 ± 0.04*	46.9 ± 2.7*	10.5 ± 0.4*	28.3 ± 4.8*

**Tabla 8.** Porcentaje de espigas amperométricas después estimular la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con cafeína 10 mM: pequeñas (0-50 pA), medianas (50-190 pA) y grandes (190-290 pA) en CCs de ratas SHRpre con su respectivo control WKY de la misma edad.

<b>Espigas</b>	<b>Pequeñas (%)</b>	<b>Medianas (%)</b>	<b>Grandes (%)</b>
<b>WKY</b> (4-5 sem) n=188	69.9	28.8	1.3
<b>SHRpre</b> (4-5 sem) n=255	65.2	33.3	1.5



**Figura 19.** Histogramas de distribución de la amplitud en las espigas amperométricas que se registraron, durante la liberación de catecolaminas, por la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , de pozas intracelulares, y producido por un pulso con cafeína 10 mM en SHRpre; además de su control WKY de 4-5 semanas.

## 7. Contribución de los receptores de rianodina en la liberación de catecolaminas en las CCs de ratas SHR prehipertensas y WKY de la misma edad.

Después de evaluar la liberación de catecolaminas —luego de la estimulación con un pulso de cafeína que dispara la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a través de los RyR— evaluamos la contribución específica de los RyR, utilizando rianodina 10  $\mu\text{M}$ , concentración en la que este agente actúa como antagonista de los RyR, presente en el retículo endoplásmico. Para ello se registró la liberación espontánea de catecolaminas, seguido por la estimulación por 5 s con  $\text{K}^+$  60 mM. Después se incubaron las CCs con una solución 10  $\mu\text{M}$  de Ry por 10 minutos, para

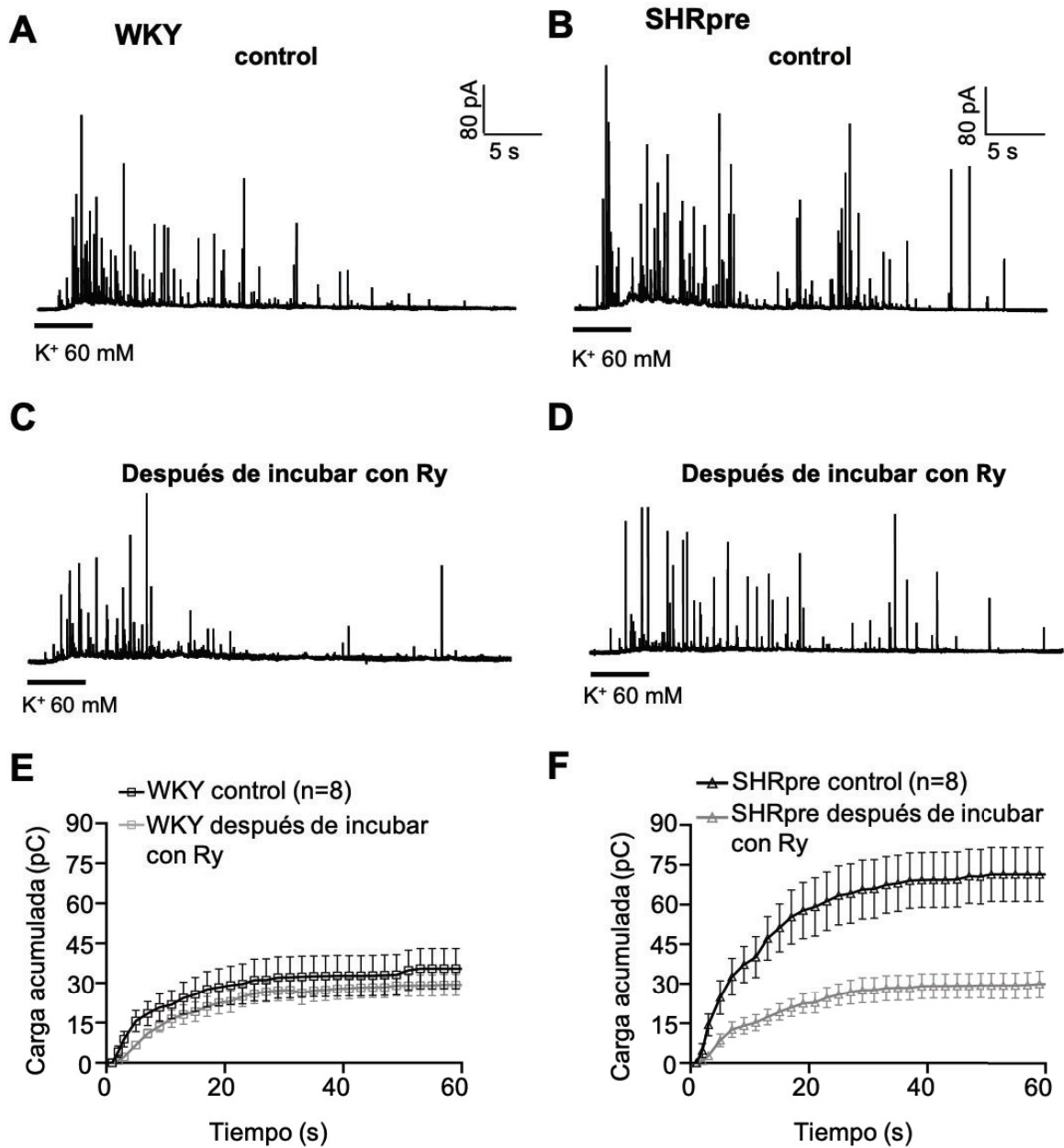
finalizar con una segunda estimulación por 5 s con  $K^+$  60 mM en presencia de Ry y se registró la actividad espontánea o basal por otros 2 minutos.

En la figura 20A-D podemos observar las espigas amperométricas —en las CCs de SHRpre y WKY— tras la estimulación con un pulso de 5 s con  $K^+$  60 mM, antes y después de la incubación con Ry 10  $\mu$ M. La carga acumulada —después de la incubación con Ry —, se redujo 57% en las CCs de SHRpre (Fig. 20F): de  $71.3 \pm 10.6$  pC a  $30.6 \pm 5.7$  pC ( $p=0.005$ ).

Po su parte, en las CCs de ratas WKY solo se redujo un 14% (Fig. 20E): de  $35.4 \pm 7.6$  pC a  $30.3 \pm 3.9$  pC ( $p=0.49$ ). La amplitud promedio y la carga promedio, también se redujeron en las CCs de SHRpre después de la incubación con Ry, de  $79.3 \pm 2.8$  pA a  $58.8 \pm 3.6$  pA y de  $0.98 \pm 0.03$  pC a  $0.84 \pm 0.05$  pC, (amplitud promedio ( $p=0.0009$ ) y carga promedio ( $p=0.04$ ) por espiga, respectivamente, mientras que el tiempo medio promedio aumentó tras la incubación con Ry, de  $8.2 \pm 0.4$  ms a  $10.2 \pm 0.5$  ms ( $p=0.006$ ).

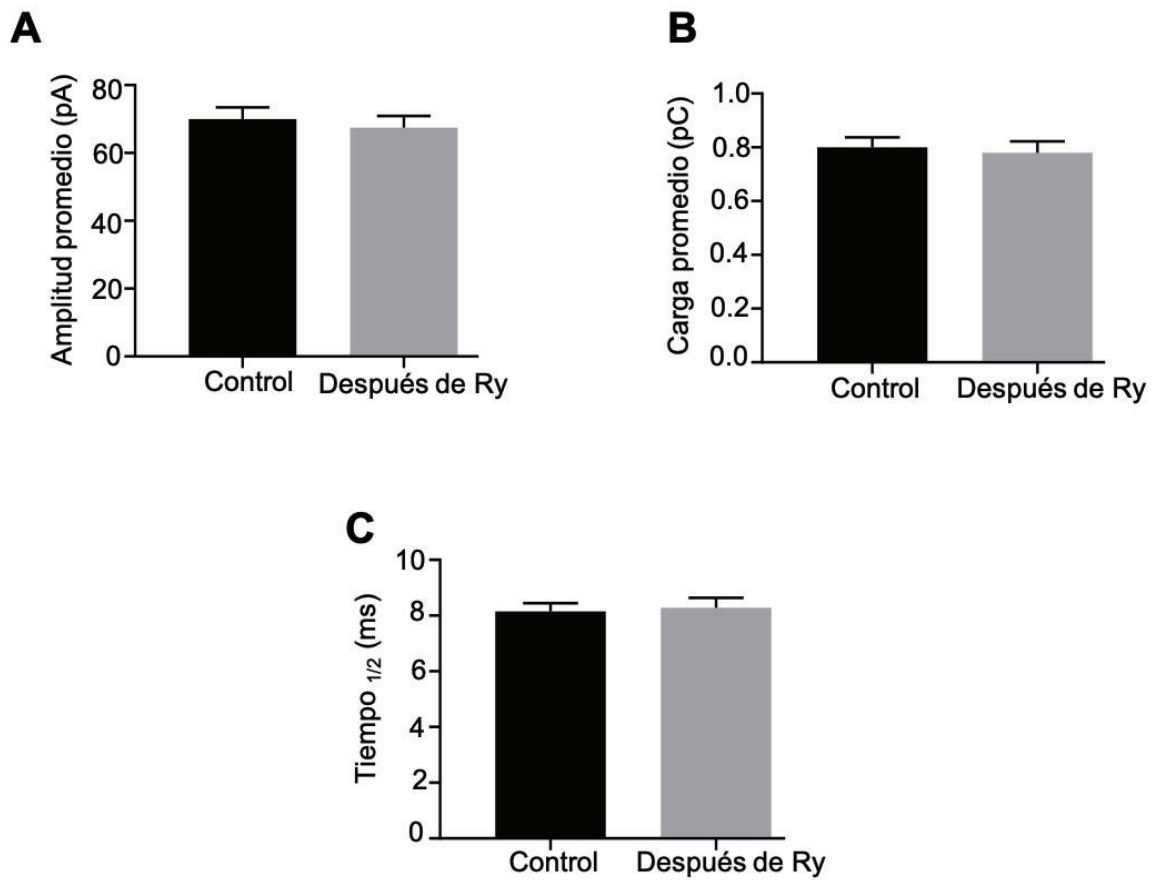
En las CCs de WKY no se encontraron cambios significativos en ninguno de los parámetros cinéticos, la amplitud promedio cambió de  $69.9 \pm 3.9$  pA a  $67.4 \pm 3.5$  pA ( $p=0.60$ ), mientras que la carga promedio por espiga fue de  $0.79 \pm 0.03$  pC a  $0.77 \pm 0.04$  ( $p=0.71$ ) y el tiempo medio cambió de  $8.1 \pm 0.3$  ms a  $8.3 \pm 0.03$  ( $p=0.76$ ), antes y después de la incubación con Ry, respectivamente. Los resultados se resumen en las figuras 21A-C, 22A-C y en la Tabla 9.

El número de espigas se redujo después de la incubación con Ry en CCs de SHRpre de  $69.4 \pm 6.5$  a  $33.4 \pm 4.7$  ( $p=0.00007$ ), mientras que en las CCs de WKY se mantuvo muy similar: de  $39.8 \pm 9.9$  a  $32.4 \pm 6.9$  ( $p=0.55$ ). Estos resultados apoyan la teoría de que en las CCs de SHRpre, los RyR tienen una mayor influencia en la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular y en la hipersecreción de catecolaminas que se produce.



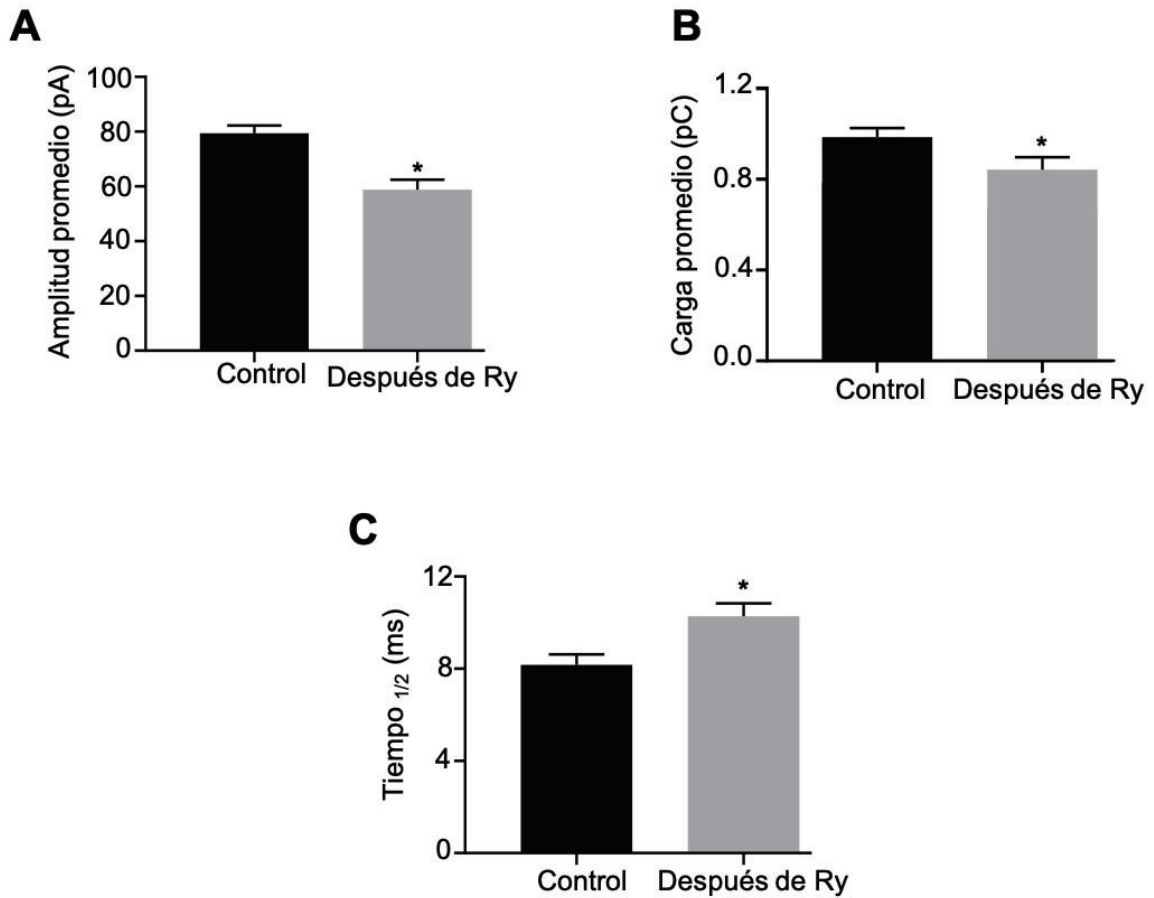
**Figura 20.** Liberación de catecolaminas después de la despolarización con un pulso de K<sup>+</sup> (60mM); antes y después de la incubación con rianodina 10 μM en CCs de ratas SHRpre y WKY de 4-5 semanas. A-D) Trazos representativos de la liberación de CA en CCs de ratas WKY de 4-5 semanas antes (A-B) y de SHRpre (C-D). E) Carga acumulada de las espigas amperométricas de CCs de ratas WKY de 4-5 semanas. F) Carga acumulada de las espigas amperométricas de CCs de ratas SHRpre. Cada punto representa la media ± ESM, n representa el número de CCs registradas.

### WKY control y después de Ry



**Figura 21.** Gráficas de parámetros cinéticos de las espigas amperométricas, en CCs de WKY de 4-5 semanas, tras la despolarización con un pulso de  $K^+$  (60 mM); antes (n=279) y después (n=227) de la incubación con rianodina. A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo  $_{1/2}$ . Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM,  $*p < 0.05$ .

### SHRpre control y después de Ry



**Figura 22.** Gráficas de parámetros cinéticos de las espigas amperométricas —en CCs de SHRpre— tras la despolarización con un pulso de  $K^+$  (60mM); antes ( $n=486$ ) y después ( $n=234$ ) de la incubación con rianodina. A) Amplitud promedio de las espigas, B) Carga promedio, C) Tiempo  $_{1/2}$ . Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM,  $*p < 0.05$ .

**Tabla 9.** Parámetros cinéticos de espigas amperométricas en CCs —antes y después de la incubación con Ry— tras la despolarización con K<sup>+</sup> 60 mM de SHRpre y control normotenso WKY.

	Carga acumulada (pC)	Carga por espiga (pC)	I <sub>max</sub> (pA)	t <sub>1/2</sub> (ms)	No. espigas
<b>WKY</b>					
<b>(4-5 sem) n= 8</b>					
Control	35.4 ± 7.6	0.79 ± 0.03	69.9 ± 3.9	8.1 ± 0.3	39.8 ± 9.9
Después de Ry	30.3 ± 3.9	0.77 ± 0.04	67.4 ± 3.5	8.3 ± 0.3	32.4 ± 6.9
<b>SHRpre</b>					
<b>(4-5 sem) n= 8</b>					
Control	71.3 ± 10.6	0.98 ± 0.03	79.3 ± 2.8	8.2 ± 0.4	69.4 ± 6.5
Después de Ry	30.6 ± 5.7*	0.84 ± 0.05*	58.8 ± 3.6*	10.2 ± 0.5*	33.4 ± 4.7*

## 8. Señales de Ca<sup>2+</sup> intracelular en CCs de SHR prehipertensas, SHR hipertensas y su correspondiente grupo control de CCs de WKY de la misma edad.

Los resultados presentados hasta ahora sugieren una mayor contribución de señales de Ca<sup>2+</sup> intracelular en las CCs de SHRpre y SHRhip, generando una hipersecreción de CA que no se observa en las CCs de WKY de la misma edad. Para evaluar las señales de Ca<sup>2+</sup> intracelular —asociados a la estimulación— se utilizaron las condiciones mencionadas anteriormente (K<sup>+</sup> 60 mM por 5 s y cafeína 10 mM por 10 s), midiendo las señales de Ca<sup>2+</sup> intracelular en cada una de las cepas.

Al evaluar la señal de Ca<sup>2+</sup> intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) —tras la despolarización, con un pulso de 5 s de K<sup>+</sup> 60 mM, después de 60 segundos de registro basal—, la amplitud del incremento de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> resultó mayor (p<0.0001) en las CCs de SHRpre

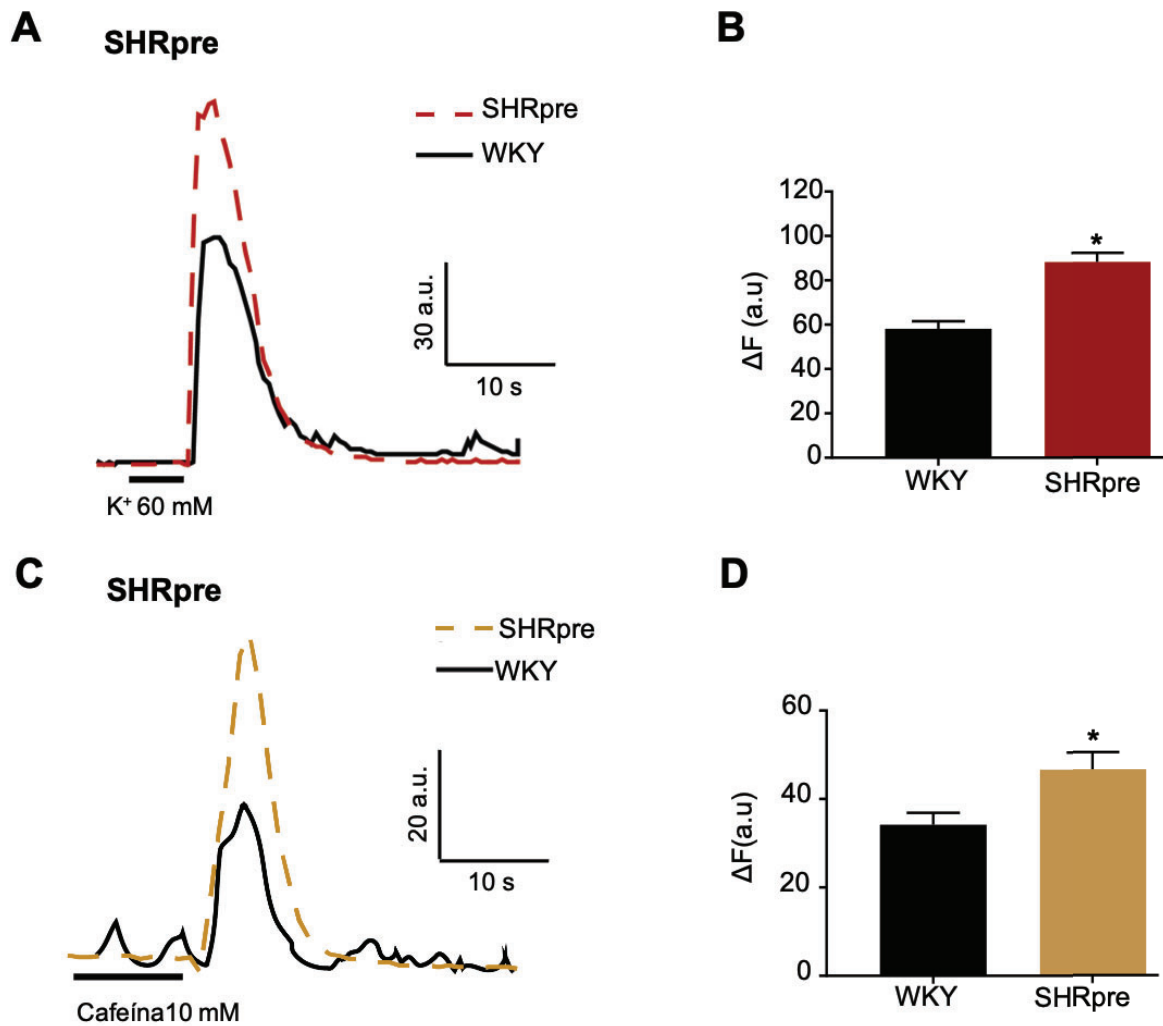


( $88.24 \pm 4.14$  a.u.), comparada con las CCs de WKY de la misma edad ( $58.15 \pm 3.36$  a.u.); Fig. 23A-B, Tabla 10. Resultados similares se obtuvieron en la  $[Ca^{2+}]_i$  de las CCs de ratas SHRhip ( $100.4 \pm 5.6$  a.u.) al compararlas con CCs de WKY de la misma edad ( $56.9 \pm 3.7$  a.u.,  $p < 0.0001$ ); Fig. 24A-B, Tabla 10.

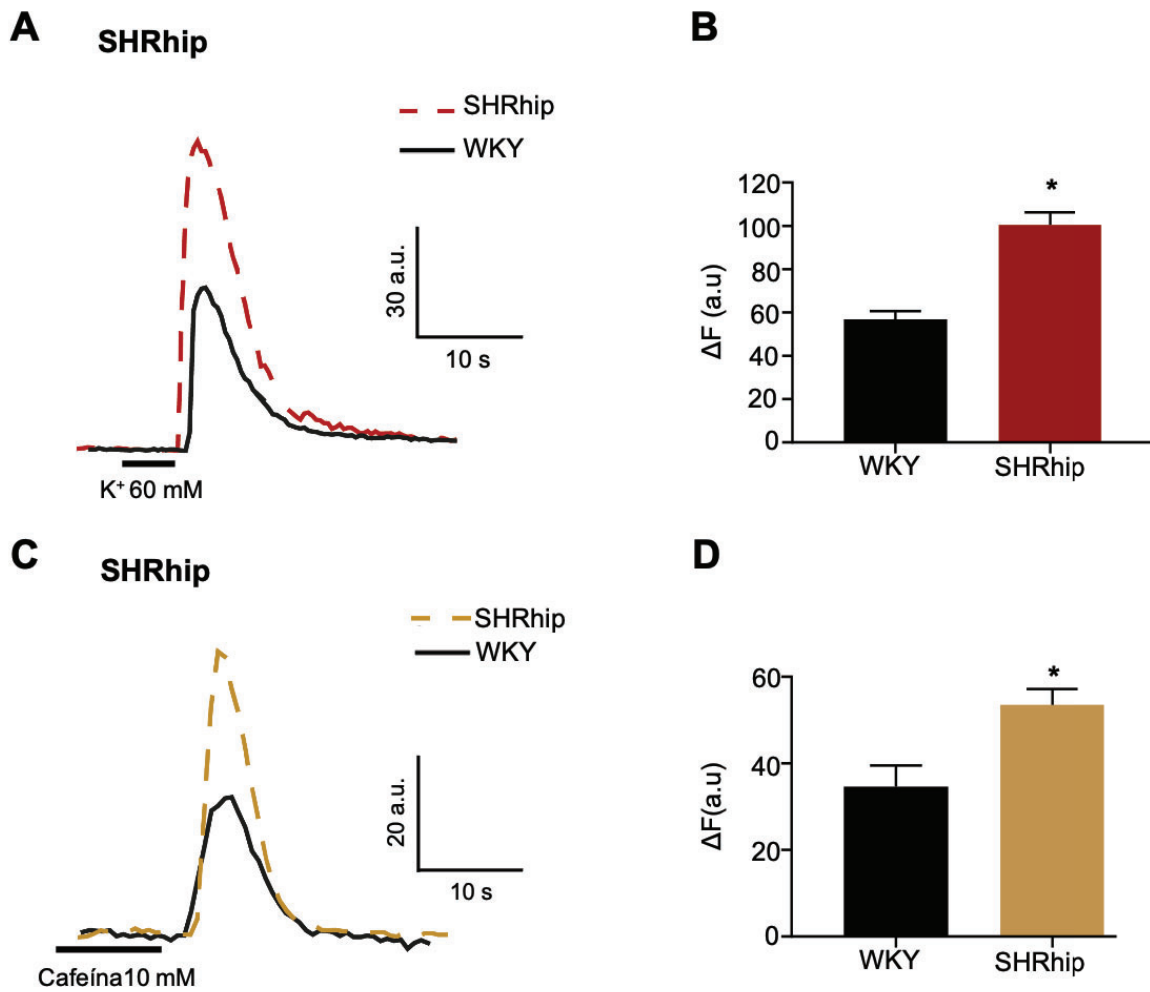
Después de la estimulación con un pulso de 10 segundos de cafeína la  $[Ca^{2+}]_i$  fue también mayor en CCs de ratas SHRpre ( $46.62 \pm 3.9$  a.u.,  $p = 0.001$ ) y SHRip ( $67.25 \pm 6.5$  a.u.), —en comparación con CCs de WKY de edades iguales—,  $34.12 \pm 2.70$  a.u para CCs de ratas WKY de 4 a 5 semanas y de  $26.21 \pm 5.7$  a.u en las WKY de 7 a 12 semanas de edad Fig. 23C-D, Fig. 24C-D, Tabla 10.

**Tabla 10.** Señales de  $Ca^{2+}$  intracelular en CCs de ratas SHRpre, SHRhip y su respectivo control normotenso WKY —de la misma edad—, tras la despolarización con  $K^+$  60 mM y la liberación de  $Ca^{2+}$  de pozas intracelulares, por medio de cafeína.

Cepa	Amplitud (a.u)	
	$K^+$ 60 mM	Cafeína
<b>WKY</b> (4-5 sem) n=89	$58.15 \pm 3.36$	$34.17 \pm 2.70$
<b>SHRpre</b> (4-5 sem) n=96	$88.24 \pm 4.14^*$	$46.62 \pm 3.91^*$
<b>WKY</b> (12 sem) n=82	$56.89 \pm 3.71$	$34.64 \pm 4.88$
<b>SHRhip</b> (12 sem) n=73	$100.4 \pm 5.85^*$	$53.54 \pm 3.61^*$



**Figura 23.** Trazos representativos de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular registradas en las CCs de ratas WKY de 4-5 semanas y de SHRpre. A) Trazos registrados tras la despolarización con  $\text{K}^+$  (60 mM). B) Gráfica de barras de la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  producida después de un pulso con  $\text{K}^+$  (60 mM). C) Trazos registrados tras la estimulación con un pulso de cafeína (10 mM). D) Gráfica de barras de la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  producida después de un pulso de cafeína (10 mM). (B y D) Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM,  $*p < 0.05$ .



**Figura 24.** Trazos representativos de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de las CCs de ratas WKY de 12 semanas y de SHRhip. A) Trazos registrados tras la despolarización con  $\text{K}^+$  (60 mM). B) Gráfica de barras de la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  producida después de un pulso con  $\text{K}^+$  (60 mM). C) Trazos registrados tras la estimulación con un pulso de cafeína (10 mM). D) Gráfica de barras de la amplitud de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  producida después de un pulso de cafeína (10 mM). (B y D) Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM,  $*p < 0.05$ .

## 9. Gránulos de secreción en CCs de ratas SHR prehipertensas y SHR hipertensas comparadas con su control normotenso WKY de la misma edad.

En los resultados de registros amperométricos observamos que la amplitud por espiga promedio, y su carga, fueron mayores en las CCs de ratas SHRpre y SHRhip, comparadas con el control normotenso WKY de cada una de las edades. Esto puede indicar que los gránulos de secreción son también de mayor tamaño en las CCs de ratas SHR.

Para comprobar esta hipótesis, adquirimos imágenes en microscopia electrónica de transmisión de los gránulos de las CCs, en ambas cepas. En la Fig. 25A-B y Fig. 26A-B, se muestran figuras representativas de CCs SHRpre y SHRhip junto con su contraparte WKY normotenso.

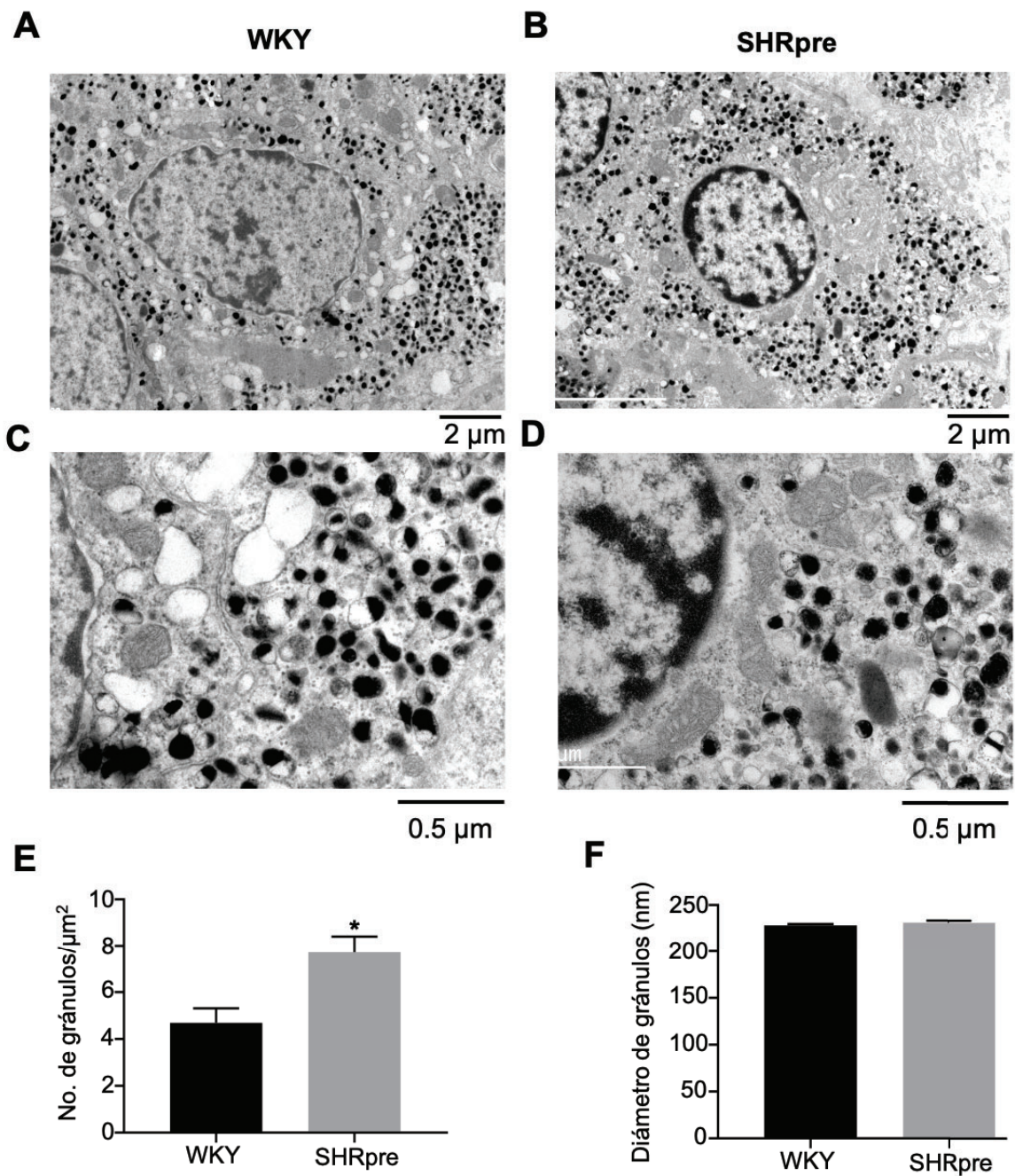
Aunque no encontramos diferencias en el tamaño de los gránulos en CCs de ratas SHRpre, comparadas con WKY de la misma edad, (Fig. 25F  $231 \pm 2$  nm en WKY y  $228 \pm 2$  nm en SHRpre,  $p=0.25$ ), sí registramos diferencias en la cantidad de gránulos por área, la cual fue mayor en las CCs de ratas SHRpre ( $7.7 \pm 0.7$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$ ,  $p=0.01$ ) comparado con su control WKY de 4-5 semanas ( $4.7 \pm 0.6$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$ ) Fig. 25E.

En las CCs de ratas SHRhip se encontraron resultados similares, donde el tamaño de los gránulos fue muy similar al control WKY de 12 semanas (SHRhip:  $235 \pm 2$  nm y WKY:  $233 \pm 3$  nm,  $p=0.64$ ) Fig.26F.

Por otro lado, al igual que en las CCs de SHRpre, los gránulos por área fueron mayor en las CCs de SHRhip ( $8.2 \pm 0.6$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$ ,  $p=0.001$ ) comparado con el control normotenso CCs de WKY de 12 semanas ( $4.5 \pm 0.7$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$ ; Fig. 26E). Además, la mayoría de ellos —en las CCs de ratas WKY y SHR de las diferentes edades— son de tamaño medio (200-400 nm; Fig. 27A-B, Tabla 11).

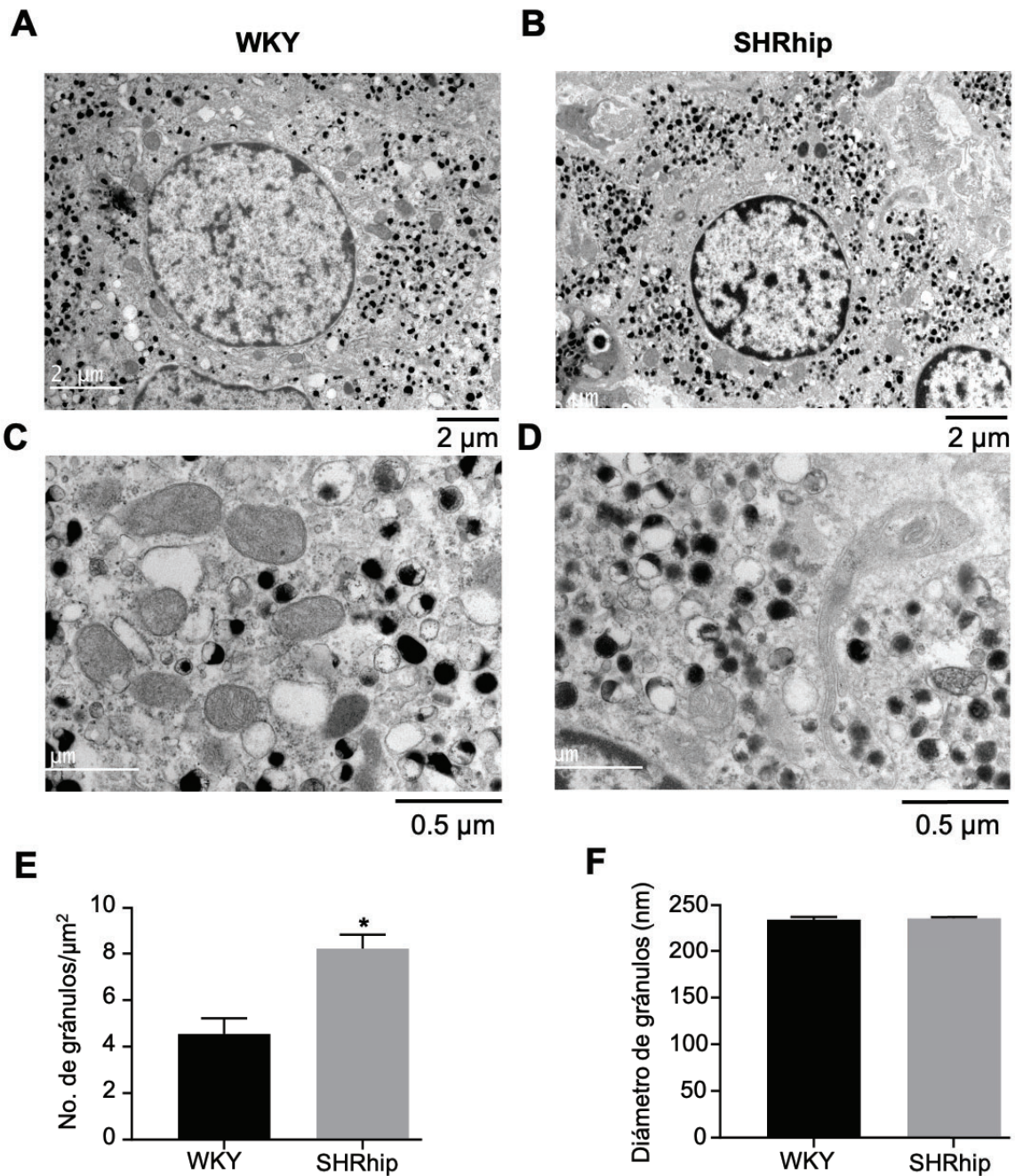
**Tabla 11.** Tamaño de gránulos en CCs de SHRpre, SHRhip y sus respectivos grupos control WKY de 4-5 semanas y WKY de 12 semanas

	<b>Pequeños (%)</b> <b>&lt;200 nm</b>	<b>Medianos (%)</b> <b>200-400 nm</b>	<b>Grandes (%)</b> <b>400-600 nm</b>
WKY <b>(4-5 sem) n=1225</b>	20.1	76.6	3.2
SHRpre <b>(4-5 sem) n=1593</b>	17.4	75.2	7.7
WKY <b>(12 sem) n=1298</b>	31.9	54.3	13.8
SHRhip <b>(12 sem) n=2170</b>	18.1	72.6	9.3

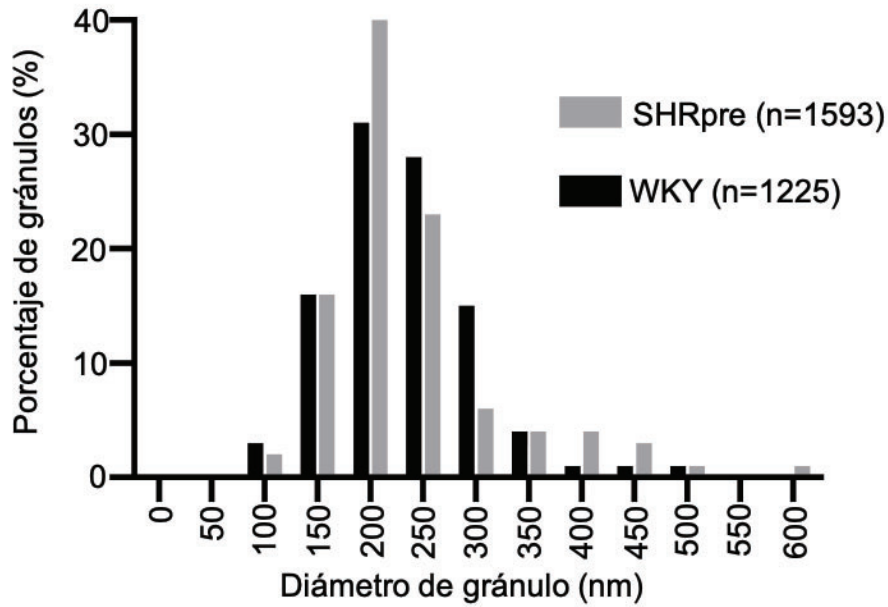
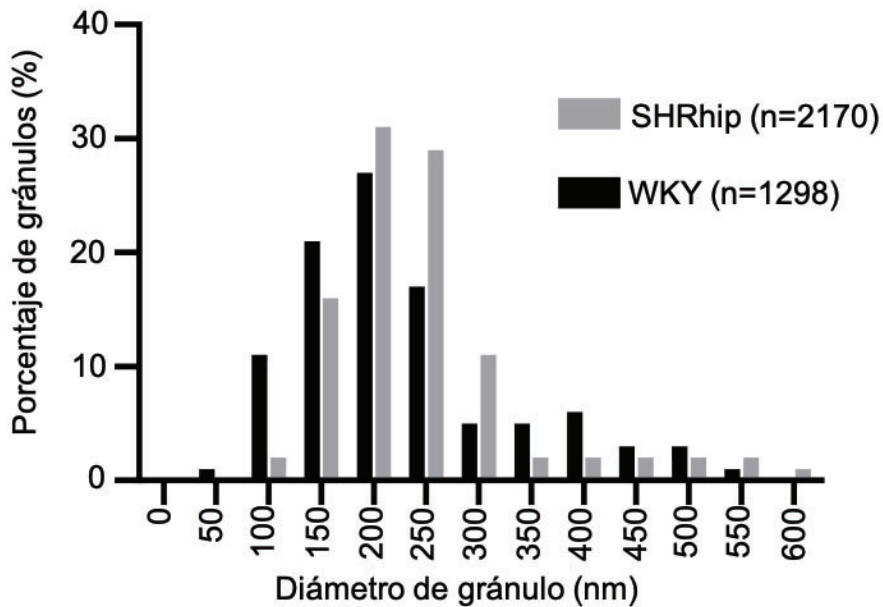


**Figura 25.** Comparación de los gránulos de secreción en CCs de ratas SHRpre con su control de WKY de 4-5 semanas. A) Micrografía representativa de CCs de WKY y (B) SHRpre. C) Mayor amplificación de los gránulos de secreción en WKY y (D) SHRpre. E) Densidad de gránulos en WKY y SHRpre. F) Área promedio de los gránulos en WKY (n=1225) y SHRpre (n=1593). (E y F) Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM,  $*p < 0.05$ . Estos resultados se obtuvieron de 15 imágenes de microscopía electrónica de las ratas SHRpre y 10 imágenes de WKY de la misma edad (n=3 ratas de cada cepa).





**Figura 26.** Comparación de los gránulos de secreción en CCs de ratas SHRhip y su control WKY de 12 semanas. A) Micrografía representativa de CCs de WKY y (B) SHRhip. C) Mayor magnificación de los gránulos de secreción en WKY y (D) SHRhip. E) Densidad de gránulos en WKY y SHRhip. F) Área promedio de los gránulos en WKY (n=1298) y SHRhip (2170). (E y F) Cada una de las gráficas representa la media  $\pm$  ESM,  $*p < 0.05$ . Estos resultados se obtuvieron de 15 imágenes de microscopía electrónica de las ratas SHRhip y 10 imágenes de WKY de la misma edad (n=3 ratas de cada cepa).

**A****B**

**Figura 27.** Histograma del porcentaje de los distintos tamaños de los gránulos de secreción en CCs de SHRpre, SHRhip y sus respectivos controles WKY (4-5 semanas y 12 semanas). A) Histograma SHRpre (columnas grises) y WKY 4-5 semanas (columnas negras). B) Histograma SHRhip (columnas grises) y WKY 12 semanas (columnas negras).



## IX. DISCUSIÓN

La presión arterial de las ratas SHR inicia con un aumento gradual (después de las 6 semanas de edad) y para la semana 10, la presión arterial sistólica se encuentra en 150 mmHg Lee et al. (1991). Las alteraciones del sistema simpatoadrenal han sido publicados en diferentes estudios en ratas SHR desde etapas prehipertensivas; en este sentido, Li et al. (2012) reportaron un aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  en neuronas simpáticas del ganglio cervical superior, tras la despolarización con  $K^+$  y a través de los RyR al estimular la salida de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico con cafeína; además de un mayor número de copias del mRNA del RyR. Shanks et al. (2013), observaron que, si bien la presión arterial se mantenía en niveles normotensos, las SHR prehipertensas presentaban taquicardia, además de niveles elevados de NA. Estos resultados, junto con la reducción en la recaptura de NA, generan un aumento en la actividad simpática. También se ha registrado, en otros estudios, la elevación de AD y NA en el plasma de ratas SHR prehipertensas (Pak, 1981; Vavřínová et al. 2019).

En otros estudios se reportó que la simpatectomía en ratas SHR neonatales da como resultado valores bajos de presión arterial en la etapa adulta, pero con valores mayores a los de las ratas WKY (Lee et al., 1987). Por otro lado, al eliminar la médula adrenal (desmedulación) en ratas SHR jóvenes (4 semanas), los valores de presión arterial en las SHR fueron menores que en el grupo que no fue desmedulado (170 mmHg vs 210 mmHg); sin embargo, al realizar el mismo tratamiento en la edad adulta no se observaron estos resultados. (Borkowski y Quinn, 1983); sólo cuando se combina la desmedulación con simpatectomía en edades juveniles, en las ratas SHR, es que se previene el desarrollo de la hipertensión (Lee et al., 1991).

En este trabajo nos enfocamos en estudiar la secreción de CA en SHR prehipertensas —con diferentes estímulos— que nos ayudaron a comprender la

participación de los CCDV (por medio de la despolarización con  $K^+$ ) y de la salida de  $Ca^{2+}$  de las pozas intracelulares (por medio de cafeína); así como las señales de  $Ca^{2+}$  producidas por los mismos estímulos y la posible presencia de gránulos de mayor tamaño en las SHR prehipertensas e hipertensas. Los valores de presión arterial de las ratas SHRpre se encuentran en los valores normales, mientras que en las SHRhip fueron similares a los reportados por Lee et al. (1991), donde los valores se encuentran alrededor de 150 mm Hg a las 12 semanas.

Al comparar la secreción de CA liberadas espontáneamente, el valor de carga acumulada —en SHRpre y SHRhip— fue mayor que en las CCs de WKY. Aunque la diferencia no fue significativa, estos resultados concuerdan con los de otros reportes (Miranda-Ferreira et al., 2008; Segura-Chama et al., 2015). Es posible que, al realizar registros de duración más larga, los resultados sean relevantes.

Por otro lado, al inducir la secreción de CA por medio de despolarización de las CCs, encontramos que la carga acumulada en las SHRpre (Fig.11) presenta un valor casi tres veces mayor (~2.9 en SHRpre) que en las CCs de ratas WKY de la misma edad.

Resulta interesante que en las SHRpre encontramos grupos de CCs con diferentes niveles de secreción (Fig. 11); el subgrupo 1 (n=12) —que consiste en la mitad de las CCs registradas en las SHRpre— y presentaron una liberación de CA muy similar a las WKY, así como parámetros cinéticos equivalentes.

La otra mitad de CCs se encuentran dentro del subgrupo 2 (n=7), el cual liberó aproximadamente 3 veces más CA que las CCs de WKY, y que nombraremos subgrupo supersecretor. El subgrupo 3 (n=5) liberó aproximadamente 6 veces más CA que las CCs de WKY y lo denominaremos subgrupo hipersecretor. Los parámetros cinéticos de los subgrupos 2 y 3 son mayores que en el grupo 1 (Tabla 4) —incluido el tiempo medio—, lo que significa que la liberación de CA va siendo más lenta en cuanto más secretan.

Tanto las CCs de SHRpre y SHRhip presentan un aumento en la liberación de CA, al comparar la carga acumulada de las CCs de WKY con cada grupo de edad correspondiente (~2.9 en SHRpre y ~2.8 en SHRhip). Al cotejar la carga acumulada de SHRpre y SHRhip, es solo 1.2 veces mayor en las CCs de SHRhip, y la amplitud de las espigas, 1.7 veces mayor en las SHRpre.

Nuestra hipótesis inicial era que las CCs de SHRpre presentarían un incremento en la secreción de CA, pero que sería de menor magnitud que en las SHRhip, y el aumento de la secreción de CA aumentaría con la edad; sin embargo, ambas cepas presentaron resultados muy similares, que se podrían explicar debido a que el tiempo medio ( $t_{1/2}$ ) —en las SHRhip— es menor (8.1 ms) que en las SHRpre (11.6 ms). Esto indica que la liberación por los gránulos de secreción es más rápida en las SHRhip.

Además, los resultados muestran que las CCs de SHRpre no cambian sus patrones de secreción de CA de manera uniforme, sino que produce un mosaico de liberación de la misma. Esto nos podría ayudar a explicar que no exista diferencia en la cantidad de CA secretadas por las CCs de SHRpre y SHRhip; aunque el subgrupo 1 de las CCs de SHRpre es casi indistinguible con las CCs de WKY, el subgrupo 2 de secreción es similar a las SHRhip y el subgrupo 3 secreta casi el doble que las CCs de SHRhip.

Además de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de los CCDV, estudiamos la contribución de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través de los RyR, los cuales liberan  $\text{Ca}^{2+}$  de este depósito en respuesta a concentraciones elevadas de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico. Este proceso es llamado liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR por sus siglas en inglés:  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  Release), el cual también ha sido descrito en diferentes reportes en CCs (Alonso et al., 1999; Hernández-Cruz, Escobar, y Jiménez, 1997; Padín et al., 2012).

La forma de abordar la pregunta de si las pozas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  —en específico el RE— contribuyen a la mayor secreción de CA —como ha sido

observado en las SHRhip (Segura-Chama et al., 2015)— fue midiendo primero la liberación de CA en CCs de SHRpre y WKY, tras un estímulo de 10 s con cafeína.

En primer lugar, debemos observar la diferencia en el tiempo en que las CCs responden al estímulo, es decir, 3 segundos después de aplicar la cafeína ya que el compuesto tiene que difundirse a través de la membrana hasta llegar a los RyR que se encuentran en el RE. En las CCs de ratas SHRpre encontramos datos similares a los reportados por Segura-Chama et al. 2015 (~1.9 veces mayor secreción en las CCs de ratas SHRpre al igual que en SHRhip ~2.0); mientras que la carga acumulada inducida por  $K^+$ , es ~2.9 veces mayor en SHRpre, lo cual se puede explicar debido a que, la estimulación con cafeína, produce menor número de espigas con menor carga (Tabla 7).

Curiosamente —al igual que los resultados obtenidos con la despolarización con  $K^+$ — las espigas de las CCs de SHRpre tienen una secreción más lenta, con un  $t_{1/2}$  por espiga mayor en las SHRpre (10.5 ms) que en las CCs de WKY (7.6 ms), (Tabla 7); y en las CCs de SHRhip (8.2 ms) es más rápida que en las CCs de WKY (10.6 ms) de la misma edad, (Segura-Chama et al., 2015).

Debido a que ambos estímulos — $K^+$  y cafeína—, generan espigas amperométricas más grandes —tanto en CCs de SHRpre como en SHRhip— al compararlas con CCs de WKY de la misma edad, nuestra hipótesis es que se debe a señales de  $Ca^{2+}$  intracelular mayores en CCs de SHR.

Las señales de  $Ca^{2+}$  intracelular —al despolarizar las CCs con  $K^+$ — presentaron resultados que concuerdan con los de secreción obtenidos con la técnica de amperometría en CCs de SHRpre y SHRhip. En ambos grupos se encontró la  $[Ca^{2+}]_i$  incrementada en comparación con los grupos control de CCs de WKY (~ 1.8 veces mayor en las CCs de SHRhip y ~ 1.5 veces mayor en SHRpre). También las señales de  $Ca^{2+}$  intracelular —inducidas por la estimulación con cafeína—, concuerdan con los resultados de secreción con un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$ , producido por la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE ~1.5 veces mayor en las CCs de

SHRhip y  $\sim 1.4$  en SHRpre, comparado con el control normotenso WKY correspondiente de cada grupo (véase la Tabla 10).

Los resultados concuerdan con los publicados en neuronas simpáticas de ratas SHRpre, en las que se reporta un aumento de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por despolarización y por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Li et al., 2012; Shanks et al., 2013), los cuales se correlacionan con la hipersecreción de CA que reportamos en este estudio.

Para evaluar de manera directa la contribución de RyR —en la secreción de CA—, utilizamos Ry 10  $\mu\text{M}$  como antagonista de los RyR (J. L. Sutko et al. 1997; Vites y Pappano, 1994). En las CCs de SHRpre rianodina se redujo la carga acumulada 57%, mientras que la amplitud promedio por espiga disminuyó un 26% y el número de espigas 52%. Esto no se observó en las CCs de WKY las cuales mostraron una pequeña reducción de 14% en la carga acumulada, solo una caída de 4% en la amplitud promedio por espiga y de 19% en el número de espigas. Sin embargo, en las CCs de SHRhip se observó una reducción mayor en la secreción de CA de 77% en la carga acumulada (Segura-Chama et al., 2015) Fig. 20-22 y Tabla 9.

Aunque hasta ahora hemos discutido que los resultados ayudan a entender los mecanismos que están alterados en las CCs SHRpre, y conducen a una hipersecreción de CA, sigue existiendo la duda de los mecanismos responsables de los cambios en las CCs en las ratas SHRpre. Dentro de este contexto, Morrison y Whitehorn (1984), registraron la respuesta nerviosa simpática a la estimulación hipotalámica del nervio esplácnico precelíaco y encontraron una mayor actividad eléctrica en SHR que en WKY. Esto podría sugerir que las fibras simpáticas que inervan las CCs de las ratas SHRpre tienen una respuesta mejorada a la estimulación hipotalámica y su respuesta sostenida desregula a las CCs de las ratas SHRpre.

Por último, medimos los gránulos de secreción en CCs de ratas SHRpre y SHRhip, así como el grupo control WKY de cada una de las edades. Tomando en

cuenta que la carga por espiga es proporcional a la concentración de CA secretadas —por medio de la raíz cubica de la carga ( $Q^{1/3}$ )— podemos estimar el tamaño de los gránulos de secreción, el cual se estimó en 336 nm en SHRpre y 235 nm en WKY (Finnegan et al., 1996; Wightman et al., 1991).

Sin embargo, los resultados obtenidos por microscopia electrónica fueron diferentes, 235 nm en SHRhip y 228 nm en SHRpre, mientras que en WKY fue de 233 nm y 231 nm, en comparación con su grupo de edad respectivo; en cambio, la densidad de gránulos en las CCs de SHRhip ( $8.2 \pm 0.6$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$ ) y SHRpre ( $7.7 \pm 0.7$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$ ) fue mayor que en los grupos control WKY ( $4.5 \pm 0.7$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$  y  $4.7 \pm 0.6$  gránulos/ $\mu\text{m}^2$ , respectivamente). Esto concuerdan con los resultados publicados por Musial et al. (2017), donde no reportaron diferencias en el tamaño de los gránulos pero si en la densidad de los gránulos.

La hipersecreción se puede explicar por el aumento en el número de gránulos de secreción en las CCs de SHR; pero no explica la mayor amplitud y carga que presentan las espigas de las CCs de SHRpre y SHRhip. Como desarrollamos en la introducción, la sinaptotagmina (syt) es una proteína sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  que actúa en el proceso de liberación de gránulos por medio de exocitosis (Bhalla, Chicka, y Chapman, 2008; Chapman, 2008). Esta proteína cuenta con varias isoformas con diferentes sensibilidades al  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, la syt VII tiene una alta afinidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que la syt IX tiene una sensibilidad intermedia y syt I baja; a su vez, cada isoforma se une a vesículas de núcleo denso de diferentes tamaños, y les confiere diferencias en la facilidad con la que desencadenaran la fusión (Zhang et al., 2011). Con base en esto, podríamos pensar que la diferente expresión de isoformas de sinaptotagmina —en los gránulos de las CCs— causan la diferencia en la secreción de un mayor número de gránulos grandes y medianos en las SHR de ratas hipertensas y prehipertensas.

Los resultados presentados en este estudio ayudan a comprender las alteraciones presentes en ratas SHRpre y la contribución del sistema simpatoadrenal en las etapas de la hipertensión arterial esencial. Sin embargo, los

mecanismos que producen el cambio en la liberación de CA en SHRpre —que se presenta en grupos de secreción, donde el 50% de las CCs liberan CA al igual que en las CCs de WKY— siguen sin una explicación. Sería muy interesante estudiar en detalle los mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipertensión esencial, como las variantes de la proteína sinaptotagmina.

## X. CONCLUSIONES

Nuestros resultados demuestran que, en promedio, las CCs de ratas SHRpre liberan una cantidad significativamente mayor de CA en respuesta a la despolarización, en comparación con las CCs de ratas WKY.

La liberación de CA producida por aplicación de cafeína, la cual libera  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico, es mayor en las CCs de las SHRpre en comparación con las CCs de las ratas WKY.

Bloqueando los RyRs con ryanodina, comprobamos que en las CCs de SHRpre la contribución de los RyR en la liberación de CA es mayor que en las CCs de las ratas WKY, aunque esta es todavía mayor en las CCs de las ratas SHRhip. Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  generadas por despolarización con  $\text{K}^+$  — y por la aplicación de cafeína— también son mayores en las CCs de SHRpre, lo cual indica que al igual que en las CCs de ratas SHRhip son las alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  lo que desencadena la hipersecreción de CA.

Aunque la amplitud promedio de las espigas amperométricas es significativamente mayor en las CCs de SHRpre y SHRhip, el tamaño promedio de sus gránulos de secreción es similar que las de las CCs de ratas WKY. En contraste, la densidad de gránulos —por unidad de área— es mayor en las CCs de las ratas SHRpre y SHRhip que en las CCs de las ratas normotensas WKY.



## XI. BIBLIOGRAFÍA

Albillos, A., G. Dernick, H. Horstmann, W. Almers, G. Alvarez de Toledo, y M. Lindau. 1997. "The Exocytotic Event in Chromaffin Cells Revealed by Patch Amperometry". *Nature* 389(6650):509–12. DOI: 10.1038/39081.

Alonso, Maria Teresa, Maria José Barrero, Pedro Michelena, Estela Carnicero, Inmaculada Cuchillo, Antonio G. García, Javier García-Sancho, Mayte Montero, y Javier Alvarez. 1999. "Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release in Chromaffin Cells Seen from inside the ER with Targeted Aequorin". *Journal of Cell Biology* 144(2):241–54. DOI: 10.1083/jcb.144.2.241.

Anón. 1976. *Spontaneously Hypertensive (SHR) Rats: Guidelines for Breeding, Care, and Use*. Washington, D.C.: National Academies Press.

Augustine, G. J., y E. Neher. 1992. "Calcium Requirements for Secretion in Bovine Chromaffin Cells." *The Journal of Physiology* 450(1):247–71. DOI: 10.1113/jphysiol.1992.sp019126.

Berridge, Michael J. 2002. "The Endoplasmic Reticulum: A Multifunctional Signaling Organelle". *Cell Calcium* 32(5–6):235–49. DOI: 10.1016/S0143416002001823.

Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, y H. Llewelyn Roderick. 2003. "Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(7):517–29. DOI: 10.1038/nrm1155.

Bhalla, Akhil, Michael C. Chicka, y Edwin R. Chapman. 2008. "Analysis of the Synaptotagmin Family during Reconstituted Membrane Fusion". *Journal of Biological Chemistry* 283(31):21799–807. DOI: 10.1074/jbc.M709628200.

Borisovska, Maria, Ying Zhao, Yaroslav Tsytsyura, Nataliya Glyvuk, Shigeo Takamori, Ulf Matti, Jens Rettig, Thomas Südhof, y Dieter Bruns. 2005. “v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion”. *The EMBO Journal* 24(12):2114–26. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600696.

Borkowski, K. R., y P. Quinn. 1983. “The Effect of Bilateral Adrenal Demedullation on Vascular Reactivity and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats”. *British Journal of Pharmacology* 80(3):429–37. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1983.tb10712.x.

Calvo-Gallardo, Enrique, Ángela López-Gil, Iago Méndez-López, Carmen Martínez-Ramírez, Juan Fernando Padín, y Antonio G. García. 2016. “Faster Kinetics of Quantal Catecholamine Release in Mouse Chromaffin Cells Stimulated with Acetylcholine, Compared with Other Secretagogues”. *Journal of Neurochemistry* 139(5):722–36. DOI: 10.1111/jnc.13849.

Camacho Pérez, Marcial, Monica Suárez Montesinos, J. D. Machado, y Ricardo Borges Jurado. 2003. “La exocitosis como mecanismo de comunicación neuronal. Una visión desde la célula cromafín”. *Revista de Neurología* 36(04):355. DOI: 10.33588/rn.3604.2003034.

Campos-Nonato, Ismael, Lucía Hernández-Barrera, Andrea Pedroza-Tobías, Catalina Medina, y Simón Barquera. 2018. “Hipertensión arterial en adultos mexicanos: prevalencia, diagnóstico y tipo de tratamiento. Ensanut MC 2016”. *Salud Pública de México* 60(3, may-jun):233. DOI: 10.21149/8813.

Carafoli, Ernesto. 1987. “INTRACELLULAR CALCIUM HOMEOSTASIS”. *Annual Review of Biochemistry* 56(1):395–433. DOI:10.1146/annurev.bi.56.070187.002143.

Carbone, Emilio, Ricardo Borges, Lee E. Eiden, Antonio G. García, y Arturo Hernández-Cruz. 2019. “Chromaffin Cells of the Adrenal Medulla: Physiology, Pharmacology, and Disease”. *Comprehensive Physiology* 9(4):1443–1502. DOI:

10.1002/cphy.c190003.

Caride, A. J., A. G. Filoteo, A. R. Penheiter, K. Pászty, Á. Enyedi, y J. T. Penniston. 2001. "Delayed Activation of the Plasma Membrane Calcium Pump by A sudden Increase in Ca<sup>2+</sup>: Fast Pumps Reside in Fast Cells". *Cell Calcium* 30(1):49–57. DOI: 10.1054/ceca.2001.0212.

Carretero, Oscar A., y Suzanne Oparil. 2000. "Essential Hypertension: Part I: Definition and Etiology". *Circulation* 101(3):329–35. DOI: 10.1161/01.CIR.101.3.329.

de Champlain, J., L. Farley, D. Cousineau, y M. R. van Ameringen. 1976.

"Circulating Catecholamine Levels in Human and Experimental Hypertension." *Circulation Research* 38(2):109–14. DOI: 10.1161/01.RES.38.2.109.

Chapman, Edwin R. 2008. "How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release?" *Annual Review of Biochemistry* 77(1):615–41. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.062005.101135.

Coupland, R. E., A. S. Pyper, y D. Hopwood. 1964. "A Method for Differentiating between Noradrenaline- and Adrenaline-Storing Cells in the Light and Electron Microscope". *Nature* 201(4925):1240–42. DOI: 10.1038/2011240b0.

Crossman, A. R., y D. Neary. 2015. *Neuroanatomía. Texto y atlas en color*. Elsevier Health Sciences Spain.

Cuchillo-Ibáñez, Inmaculada, Almudena Albillos, Marcos Aldea, Gloria Arroyo, Jorge Fuentealba, y Antonio G. García. 2002. "Calcium Entry, Calcium Redistribution, and Exocytosis". *Annals of the New York Academy of Sciences* 971(1):108–16. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04444.x.

Currie, Gemma, E. Marie Freel, Colin G. Perry, y Anna F. Dominiczak. 2012. "Disorders of Blood Pressure Regulation—Role of Catecholamine Biosynthesis, Release, and Metabolism". *Current Hypertension Reports* 14(1):38–45. DOI:

10.1007/s11906-011-0239-2.

Dhara, Madhurima, Antonio Yarzagaray, Yvonne Schwarz, Soumyajit Dutta, Chad Grabner, Paanteha K. Moghadam, Anneka Bost, Claudia Schirra, Jens Rettig, Kerstin Reim, Nils Brose, Ralf Mohrmann, y Dieter Bruns. 2014. "Complexin Synchronizes Primed Vesicle Exocytosis and Regulates Fusion Pore Dynamics". *Journal of Cell Biology* 204(7):1123–40. DOI: 10.1083/jcb.201311085.

Díaz-Flores, L., R. Gutiérrez, H. Varela, F. Valladares, H. Alvarez-Argüelles, y R. Borges. 2007. "Histogenesis and Morphofunctional Characteristics of Chromaffin Cells: Functional Morphology of Chromaffin Cells". *Acta Physiologica* 192(2):145–63. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2007.01811.x.

Dornas, Waleska C., y Marcelo E. Silva. 2011. "Animal Models for the Study of Arterial Hypertension". *Journal of Biosciences* 36(4):731–37. DOI: 10.1007/s12038-011-9097-y.

Douglas, W. W. 1968. "Stimulus-Secretion Coupling: The Concept and Clues from Chromaffin and Other Cells". *British Journal of Pharmacology* 34(3):451–74. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1968.tb08474.x.

Douglas, W. W., y R. P. Rubin. 1961a. "Mechanism of Nicotinic Action at the Adrenal Medulla: Calcium as a Link in Stimulus-Secretion Coupling". *Nature* 192(4807):1087–89. DOI: 10.1038/1921087b0.

Douglas, W. W., y R. P. Rubin. 1961b. "The Role of Calcium in the Secretory Response of the Adrenal Medulla to Acetylcholine". *The Journal of Physiology* 159(1):40–57. DOI: 10.1113/jphysiol.1961.sp006791.

Dutt, Meghan, Chase J. Wehrle, y Ishwarlal Jialal. 2022. "Physiology, Adrenal Gland". en *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Eränkö, O. 1955. "Distribution of Adrenaline and Noradrenaline in the Adrenal Medulla". *Nature* 175(4445):88–89. DOI: 10.1038/175088a0.

Fernández, Pedro Lorenzo. 2015. *Farmacología Básica y Clínica*. Ed. Medica Panamericana.

Finnegan, J. M., K. Pihel, P. S. Cahill, L. Huang, S. E. Zerby, A. G. Ewing, R. T. Kennedy, y R. M. Wightman. 1996. "Vesicular Quantal Size Measured by Amperometry at Chromaffin, Mast, Pheochromocytoma, and Pancreatic Beta-Cells". *Journal of Neurochemistry* 66(5):1914–23. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1996.66051914.x.

Fisher, J. P., y J. F. R. Paton. 2012. "The Sympathetic Nervous System and Blood Pressure in Humans: Implications for Hypertension". *Journal of Human Hypertension* 26(8):463–75. DOI: 10.1038/jhh.2011.66.

Flaa, Arnljot, Håvard H. Mundal, Ivar Eide, Sverre Kjeldsen, y Morten Rostrup. 2006. "Sympathetic Activity and Cardiovascular Risk Factors in Young Men in the Low, Normal, and High Blood Pressure Ranges". *Hypertension* 47(3):396–402. DOI: 10.1161/01.HYP.0000203952.27988.79.

Gandía, Luis, Ricardo Borges, Almudena Albillos, y Antonio G. García. 1995. "Multiple Calcium Channel Subtypes in Isolated Rat Chromaffin Cells". *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 430(1):55–63. DOI: 10.1007/BF00373839.

García, Antonio G., Antonio M. García-De-Diego, Luis Gandía, Ricardo Borges, y Javier García-Sancho. 2006. "Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells". *Physiological Reviews* 86(4):1093–1131. DOI: 10.1152/physrev.00039.2005.

García, Antonio G., Fernando Padín, José C. Fernández-Morales, Marcos Maroto, y Javier García-Sancho. 2012. "Cytosolic Organelles Shape Calcium Signals and Exo–Endocytotic Responses of Chromaffin Cells". *Cell Calcium* 51(3–4):309–20. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.12.004.

Gibbins, Ian. 2013. "Functional Organization of Autonomic Neural Pathways". *Organogenesis* 9(3):169–75. DOI: 10.4161/org.25126.

Gimenez-Molina, Yolanda, José Villanueva, Carmen Nanclares, Inmaculada Lopez-Font, Salvador Viniegra, Maria del Mar Francés, Luis Gandia, Amparo Gil, y Luis M. Gutiérrez. 2017. "The Differential Organization of F-Actin Alters the Distribution of Organelles in Cultured When Compared to Native Chromaffin Cells". *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11:135. DOI: 10.3389/fncel.2017.00135.

Goldstein, D. S. 1983. "Plasma Catecholamines and Essential Hypertension. An Analytical Review." *Hypertension* 5(1):86–99. DOI: 10.1161/01.HYP.5.1.86.

Grassi, Guido, Bianca M. Cattaneo, Gino Seravalle, Antonio Lanfranchi, y Giuseppe Mancia. 1998. "Baroreflex Control of Sympathetic Nerve Activity in Essential and Secondary Hypertension". *Hypertension* 31(1):68–72. DOI: 10.1161/01.HYP.31.1.68.

Grassi, Guido, Fosca Quarti-Trevano, Raffaella Dell’Oro, y Giuseppe Mancia. 2008. "Essential Hypertension and the Sympathetic Nervous System". *Neurological Sciences* 29(S1):33–36. DOI: 10.1007/s10072-008-0882-9.

Hall, J. E. 2010. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Health Sciences.

Hernández-Cruz, A., M. Díaz-Muñoz, M. Gómez-Chavarín, R. Cañedo-Merino, D. A. Protti, A. L. Escobar, J. Sierralta, y B. A. Suárez-Isla. 1995. "Properties of the Ryanodine-Sensitive Release Channels That Underlie Caffeine-Induced Ca<sup>2+</sup> Mobilization from Intracellular Stores in Mammalian Sympathetic Neurons". *The European Journal of Neuroscience* 7(8):1684–99. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb00690.x.

Hernández-Cruz, Arturo, Ariel L. Escobar, y Nicolás Jiménez. 1997. "Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release Phenomena in Mammalian Sympathetic Neurons Are Critically

Dependent on the Rate of Rise of Trigger Ca<sup>2+</sup>”. *Journal of General Physiology* 109(2):147–67. DOI: 10.1085/jgp.109.2.147.

Hill, R. W., y G. A. Wyse. 2006. *Fisiología Animal*. Editorial Medica Panamericana Sa de.

Huber, Katrin, Chaya Kalcheim, y Klaus Unsicker. 2009. “The Development of the Chromaffin Cell Lineage from the Neural Crest”. *Autonomic Neuroscience* 151(1):10–16. DOI: 10.1016/j.autneu.2009.07.020.

Huch, R., y S. Engelhardt. 2011. *Mensch, Körper, Krankheit: Anatomie, Physiologie, Krankheitsbilder; Lehrbuch und Atlas für die Berufe im Gesundheitswesen*. Elsevier, Urban & Fischer.

Julius, Stevo, Lisa Krause, Nicholas J. Schork, Agnes D. Mejia, Kerin A. Jones, Cosmas van de Ven, Ernest H. Johnson, M. Abed Sekkarie, Sverre Erik Kjeldsen, Jurij Petrin, Robert Schmouder, Rakesh Gupta, James Ferraro, Pietro Nazzaro, y Joel Weissfeld. 1991. “Hyperkinetic Borderline Hypertension in Tecumseh, Michigan”: *Journal of Hypertension* 9(1):77–84. DOI: 10.1097/00004872-199101000-00012.

Kelly, Regis B. 1985. “Pathways of Protein Secretion in Eukaryotes”. *Science* 230(4721):25–32. DOI: 10.1126/science.2994224.

Krishnakumar, Shyam S., Daniel T. Radoff, Daniel Kümmel, Claudio G. Giraud, Feng Li, Lavan Khandan, Stephanie Wood Baguley, Jeff Coleman, Karin M. Reinisch, Frederic Pincet, y James E. Rothman. 2011. “A Conformational Switch in Complexin Is Required for Synaptotagmin to Trigger Synaptic Fusion”. *Nature Structural & Molecular Biology* 18(8):934–40. DOI: 10.1038/nsmb.2103.

Kvetnansky, Richard, Esther L. Sabban, y Miklos Palkovits. 2009.

“Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic

Approaches”. *Physiological Reviews* 89(2):535–606. DOI: 10.1152/physrev.00042.2006.

Laflamme, Annik K., Laurence Oster, René Cardinal, y Jacques de Champlain. 1997. “Effects of Renin-Angiotensin Blockade on Sympathetic Reactivity and  $\beta$ -Adrenergic Pathway in the Spontaneously Hypertensive Rat”. *Hypertension* 30(2):278–87. DOI: 10.1161/01.HYP.30.2.278.

Lee, R. M., K. R. Borkowski, F. H. Leenen, J. Tsoporis, y M. Coughlin. 1991. “Combined Effect of Neonatal Sympathectomy and Adrenal Demedullation on Blood Pressure and Vascular Changes in Spontaneously Hypertensive Rats.” *Circulation Research* 69(3):714–21. DOI: 10.1161/01.RES.69.3.714.

Lee, R. M., C. R. Triggle, D. W. Cheung, y M. D. Coughlin. 1987. “Structural and Functional Consequence of Neonatal Sympathectomy on the Blood Vessels of Spontaneously Hypertensive Rats”. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 10(3):328–38. DOI: 10.1161/01.hyp.10.3.328.

Lee, Sanghwa, Jonghyeok Shin, Younghun Jung, Heyjin Son, Jaeil Shin, Cherlhyun Jeong, Dae-Hyuk Kweon, y Yeon-Kyun Shin. 2020. “Munc18-1 Induces Conformational Changes of Syntaxin-1 in Multiple Intermediates for SNARE Assembly”. *Scientific Reports* 10(1):11623. DOI: 10.1038/s41598-020-68476-3.

Li, Dan, Chee-wan Lee, Keith Buckler, Anant Parekh, Neil Herring, y David J. Paterson. 2012. “Abnormal Intracellular Calcium Homeostasis in Sympathetic Neurons From Young Prehypertensive Rats”. *Hypertension* 59(3):642–49. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186460.

Liang, Kuo, Lisi Wei, y Liangyi Chen. 2017. “Exocytosis, Endocytosis, and Their Coupling in Excitable Cells”. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00109.

Lim, D. Y., S. J. Jang, y D. G. Park. 2002. “Comparison of Catecholamine Release in the Isolated Adrenal Glands of SHR and WKY Rats”. *Autonomic and Autacoid*



*Pharmacology* 22(4):225–32. DOI: 10.1046/j.1474-8673.2002.00264.x.

Liu, Y., C. Schirra, D. R. Stevens, U. Matti, D. Speidel, D. Hof, D. Bruns, N. Brose, y J. Rettig. 2008. “CAPS Facilitates Filling of the Rapidly Releasable Pool of Large Dense-Core Vesicles”. *Journal of Neuroscience* 28(21):5594–5601. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5672-07.2008.

Louis, W. J., y L. G. Howes. 1990. “Genealogy of the Spontaneously Hypertensive Rat and Wistar-Kyoto Rat Strains: Implications for Studies of Inherited Hypertension”. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 16 Suppl 7:S1-5.

Lüllmann, H., K. Mohr, y L. Hein. 2010. *Farmacología: texto y atlas*. Ed. Medica Panamericana.

Lundin, S. A., y M. Hallback-Nordlander. 1980. “Background of Hyperkinetic Circulatory State in Young Spontaneously Hypertensive Rats”. *Cardiovascular Research* 14(10):561–67. DOI: 10.1093/cvr/14.10.561.

Mahapatra, S., C. Calorio, D. H. F. Vandael, A. Marcantoni, V. Carabelli, y E. Carbone. 2012. “Calcium Channel Types Contributing to Chromaffin Cell Excitability, Exocytosis and Endocytosis”. *Cell Calcium* 51(3–4):321–30. DOI: 10.1016/j.ceca.2012.01.005.

Malgaroli, A., R. Fesce, y J. Meldolesi. 1990. “Spontaneous  $[Ca^{2+}]_i$  Fluctuations in Rat Chromaffin Cells Do Not Require Inositol 1,4,5-Trisphosphate Elevations but Are Generated by a Caffeine- and Ryanodine-Sensitive Intracellular  $Ca^{2+}$  Store”. *The Journal of Biological Chemistry* 265(6):3005–8.

Mancia, Giuseppe, y Guido Grassi. 2014. “The Autonomic Nervous System and Hypertension”. *Circulation Research* 114(11):1804–14. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302524.

Mancia, Giuseppe, Guido Grassi, Cristina Giannattasio, y Gino Seravalle. 1999. “Sympathetic Activation in the Pathogenesis of Hypertension and Progression of

Organ Damage”. *Hypertension* 34(4):724–28. DOI: 10.1161/01.HYP.34.4.724.

Marengo, Fernando D., y Ana M. Cárdenas. 2018. “How Does the Stimulus Define Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells?” *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 470(1):155–67. DOI: 10.1007/s00424-017-2052-5.

Michael-Titus, Adina, Patricia Revest, y Peter Shortland. 2014. *The Nervous System: System of the Body Series*. 2a ed. Elsevier Health Sciences.

Miranda-Ferreira, Regiane, Ricardo de Pascual, Antonio M. G. de Diego, Afonso Caricati-Neto, Luis Gandía, Aron Jurkiewicz, y Antonio G. García. 2008. “Single-Vesicle Catecholamine Release Has Greater Quantal Content and Faster Kinetics in Chromaffin Cells from Hypertensive, as Compared with Normotensive, Rats”. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324(2):685–93. DOI: 10.1124/jpet.107.128819.

Misonou, Hiroaki, Mica Ohara-Imaizumi, y Konosuke Kumakura. 1997. “Regulation of the Priming of Exocytosis and the Dissociation of SNAP-25 and VAMP-2 in Adrenal Chromaffin Cells”. *Neuroscience Letters* 232(3):182–84. DOI: 10.1016/S0304-3940(97)00608-3.

Miyazaki, Shun-ichi. 1993. “IP<sub>3</sub> Receptor-Mediated Spatial and Temporal Ca<sup>2+</sup> Signaling of the Cell.” *The Japanese Journal of Physiology* 43(4):409–34. DOI: 10.2170/jjphysiol.43.409.

Morrison, S. F., y D. Whitehorn. 1984. “Enhanced Preganglionic Sympathetic Nerve Responses in Spontaneously Hypertensive Rats”. *Brain Research* 296(1):152–55. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90522-5.

Mosharov, Eugene V., y David Sulzer. 2005. “Analysis of Exocytotic Events Recorded by Amperometry”. *Nature Methods* 2(9):651–58. DOI: 10.1038/nmeth782.

Musial, Diego C., Guilherme H. Bomfim, Juan A. Arranz-Tagarro, Iago Méndez-

López, Regiane Miranda-Ferreira, Aron Jurkiewicz, Neide H. Jurkiewicz, Antonio G. García, y Juan F. Padín. 2017. "Altered Mitochondrial Function, Calcium Signaling, and Catecholamine Release in Chromaffin Cells of Diabetic and SHR Rats". *European Journal of Pharmacology* 815:416–26. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.09.045.

Nassar-Gentina, V., H. B. Pollard, y E. Rojas. 1988. "Electrical Activity in Chromaffin Cells of Intact Mouse Adrenal Gland". *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 254(5):C675–83. DOI: 10.1152/ajpcell.1988.254.5.C675.

Okamoto, Kozo, y Kyuzo Aoki. 1963. "Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats". *Japanese Circulation Journal* 27(3):282–93. DOI: 10.1253/jcj.27.282.

Padawer, Jacques. 1998. "Exocytosis". Pp. 849–56 en *Encyclopedia of Immunology*. Elsevier.

Padín, Juan Fernando, Antonio M. G. de Diego, José Carlos Fernández-Morales, Cristina Merino, Marcos Maroto, Enrique Calvo-Gallardo, Juan Alberto Arranz, Matilde Yáñez, y Antonio G. García. 2012. "Resveratrol Augments Nitric Oxide Generation and Causes Store Calcium Release in Chromaffin Cells". *European Journal of Pharmacology* 685(1–3):99–107. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.03.040.

Pak, Chun Ho. 1981. "Plasma Adrenaline and Noradrenaline Concentrations of the Spontaneously Hypertensive Rat." *Japanese Heart Journal* 22(6):987–95. DOI: 10.1536/ihj.22.987.

Paravati, Stephen, Alan Rosani, y Steven J. Warrington. 2022. "Physiology, Catecholamines". en *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Pechstein, Arndt, Fabian Gerth, Ira Milosevic, Maria Jäpel, Marielle Eichhorn-Grünig, Olga Vorontsova, Jelena Bacetic, Tanja Maritzen, Oleg Shupliakov, Christian Freund, y Volker Haucke. 2015. "Vesicle Uncoating Regulated by SH 3-

SH 3 Domain-mediated Complex Formation between Endophilin and Intersectin at Synapses”. *EMBO Reports* 16(2):232–39. DOI: 10.15252/embr.201439260.

Perlman, Robert L., y Martin Chalfie. 1977. “Catecholamine Release from the Adrenal Medulla”. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 6(3):551–76. DOI: 10.1016/S0300-595X(77)80071-6.

Plattner, Helmut, Antonio R. Artalejo, y Erwin Neher. 1997. “Ultrastructural Organization of Bovine Chromaffin Cell Cortex—Analysis by Cryofixation and Morphometry of Aspects Pertinent to Exocytosis”. *Journal of Cell Biology* 139(7):1709–17. DOI: 10.1083/jcb.139.7.1709.

Schaub, Johanna R., Xiaobing Lu, Blair Doneske, Yeon-Kyun Shin, y James A. McNew. 2006. “Hemifusion Arrest by Complexin Is Relieved by Ca<sup>2+</sup>–Synaptotagmin I”. *Nature Structural & Molecular Biology* 13(8):748–50. DOI: 10.1038/nsmb1124.

Scherubl, H., y J. Hescheler. 1995. *The Electrophysiology of Neuroendocrine Cells*. Taylor & Francis.

Segura-Chama, Pedro, Adán Hernández, Nicolás Jiménez-Pérez, Tzitzitlini Alejandre-García, Claudia V. Rivera-Cerecedo, Jesús Hernández-Guijo, y Arturo Hernández-Cruz. 2010. “Comparison of Ca<sup>2+</sup> Currents of Chromaffin Cells from Normotensive Wistar Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats”. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30(8):1243–50. DOI: 10.1007/s10571-010-9566-0.

Segura-Chama, Pedro, Patricia López-Bistrain, Elia Martha Pérez-Armendáriz, Nicolás Jiménez-Pérez, Diana Millán-Aldaco, y Arturo Hernández-Cruz. 2015. “Enhanced Ca<sup>2+</sup>-Induced Ca<sup>2+</sup> Release from Intracellular Stores Contributes to Catecholamine Hypersecretion in Adrenal Chromaffin Cells from Spontaneously Hypertensive Rats”. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 467(11):2307–23. DOI: 10.1007/s00424-015-1702-8.

Shanks, Julia, Neil Herring, Errin Johnson, Kun Liu, Dan Li, y David J. Paterson. 2017. "Overexpression of Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a Promotes Cardiac Sympathetic Neurotransmission via Abnormal Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Ca<sup>2+</sup> Regulation". *Hypertension* 69(4):625–32. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08507.

Shanks, Julia, Saras Mane, Rebecca Ryan, y David J. Paterson. 2013. "Ganglion-Specific Impairment of the Norepinephrine Transporter in the Hypertensive Rat". *Hypertension* 61(1):187–93. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.202184.

Shanks, Julia, Sotiria Manou-Stathopoulou, Chieh-Ju Lu, Dan Li, David J. Paterson, y Neil Herring. 2013. "Cardiac Sympathetic Dysfunction in the Prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rat". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 305(7):H980–86. DOI: 10.1152/ajpheart.00255.2013.

Singh, Mukesh, George A. Mensah, y George Bakris. 2010. "Pathogenesis and Clinical Physiology of Hypertension". *Cardiology Clinics* 28(4):545–59. DOI: 10.1016/j.ccl.2010.07.001.

Snell, Richard S. 2007. *Neuroanatomía clínica*. Ed. Medica Panamericana.

Stevens, David R., Claudia Schirra, Ute Becherer, y Jens Rettig. 2011. "Vesicle Pools: Lessons from Adrenal Chromaffin Cells". *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 3. DOI: 10.3389/fnsyn.2011.00002.

Sutko, J. L., J. A. Airey, W. Welch, y L. Ruest. 1997. "The Pharmacology of Ryanodine and Related Compounds". *Pharmacological Reviews* 49(1):53–98.

Sutko, John I., Judith A. Airey, William Welch, y Luc Ruest. 1997. "The pharmacology of Ryanodine and Related Compounds". *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 49(1).

Sørensen, JakobBalslev. 2004. "Formation, Stabilisation and Fusion of the Readily Releasable Pool of Secretory Vesicles". *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 448(4). DOI: 10.1007/s00424-004-1247-8.

Vavřínová, Anna, Michal Behuliak, Michal Bencze, Martin Vodička, Peter Ergang, Ivana Vaněčková, y Josef Zicha. 2019. "Sympathectomy-Induced Blood Pressure Reduction in Adult Normotensive and Hypertensive Rats Is Counteracted by Enhanced Cardiovascular Sensitivity to Vasoconstrictors". *Hypertension Research* 42(12):1872–82. DOI: 10.1038/s41440-019-0319-2.

Vites, A. M., y J. Pappano. 1994. "Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 268(3):1476–84.

Vlachakis, Nicolas D., Natalie Alexander, y Robert F. Maronde. 1980. "Increased Plasma Normetanephrine in Spontaneously Hypertensive Rats". *Clinical and Experimental Hypertension* 2(2):309–19. DOI: 10.3109/10641968009046426.

Voets, Thomas, Erwin Neher, y Tobias Moser. 1999. "Mechanisms Underlying Phasic and Sustained Secretion in Chromaffin Cells from Mouse Adrenal Slices". *Neuron* 23(3):607–15. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80812-0.

Wallace, Damian J., Chen Chen, y Philip D. Marley. 2002. "Histamine Promotes Excitability in Bovine Adrenal Chromaffin Cells by Inhibiting an M-current". *The Journal of Physiology* 540(3):921–39. DOI: 10.1113/jphysiol.2001.013370.

Wightman, R. M., J. A. Jankowski, R. T. Kennedy, K. T. Kawagoe, T. J. Schroeder, D. J. Leszczyszyn, J. A. Near, E. J. Diliberto, y O. H. Viveros. 1991. "Temporally Resolved Catecholamine Spikes Correspond to Single Vesicle Release from Individual Chromaffin Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(23):10754–58. DOI: 10.1073/pnas.88.23.10754.

Wilson, Foster D. Wilson J. 1992. *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders.  
Wit, Heidi de, L. Niels Cornelisse, Ruud F. G. Toonen, y Matthijs Verhage. 2006. "Docking of Secretory Vesicles Is Syntaxin Dependent" editado por J. Gruenberg. *PLoS ONE* 1(1):e126. DOI: 10.1371/journal.pone.0000126.

de Wit, Heidi, Alexander M. Walter, Ira Milosevic, Attila Gulyás-Kovács, Dietmar Riedel, Jakob B. Sørensen, y Matthijs Verhage. 2009. “Synaptotagmin-1 Docks Secretory Vesicles to Syntaxin-1/SNAP-25 Acceptor Complexes”. *Cell* 138(5):935–46. DOI: 10.1016/j.cell.2009.07.027.

Xu, Y., y E. J. Forsberg. 1993. “Effects of Caffeine on Cholinergic Agonist- and K(+)-Induced Cytosolic Ca<sup>++</sup> Signals and Secretion in Porcine Adrenal Chromaffin Cells”. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 264(2):770–75.

Zhang, Zhen, Yao Wu, Zhao Wang, F. Mark Dunning, Jonathan Rehfuss, Deepshika Ramanan, Edwin R. Chapman, y Meyer B. Jackson. 2011. “Release Mode of Large and Small Dense-Core Vesicles Specified by Different Synaptotagmin Isoforms in PC12 Cells” editado por P. Brennwald. *Molecular Biology of the Cell* 22(13):2324–36. DOI: 10.1091/mbc.e11-02-0159.

## **XII. APÉNDICE**





# Development of the hypersecretory phenotype in the population of adrenal chromaffin cells from prehypertensive SHR

Johanna Guadalupe Peña del Castillo<sup>1</sup> · Pedro Segura-Chama<sup>2</sup> · Ruth Rincón-Heredia<sup>3</sup> · Diana Millán-Aldaco<sup>1</sup> · Yolanda Giménez-Molina<sup>4</sup> · José Villanueva<sup>4</sup> · Luis Miguel Gutiérrez<sup>4</sup> · Arturo Hernández-Cruz<sup>1,5</sup> 

Received: 30 April 2021 / Revised: 10 August 2021 / Accepted: 11 August 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

## Abstract

The hypersecretory phenotype of adrenal chromaffin cells (CCs) from early spontaneously hypertensive rats (SHRs) mainly results from enhanced  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release (CICR). A key question is if these abnormalities can be traced to the prehypertensive stage. Spontaneous and stimulus-induced catecholamine exocytosis, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals, and dense-core granule size and density were examined in CCs from prehypertensive and hypertensive SHRs and compared with age-matched Wistar-Kyoto rats (WKY). During the prehypertensive stage, the depolarization-elicited catecholamine exocytosis was ~2.9-fold greater in SHR than in WKY CCs. Interestingly, in half of CCs the exocytosis was indistinguishable from WKY CCs, while it was between 3- and sixfold larger in the other half. Likewise, caffeine-induced exocytosis was ~twofold larger in prehypertensive SHR. Accordingly, depolarization and caffeine application elicited  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises ~1.5-fold larger in prehypertensive SHR than in WKY CCs. Ryanodine reduced the depolarization-induced secretion in prehypertensive SHR by 57%, compared to 14% in WKY CCs, suggesting a greater contribution of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release to exocytosis. In SHR CCs, the mean spike amplitude and charge per spike were significantly larger than in WKY CCs, regardless of age and stimulus type. This difference in granule content could explain in part the enhanced exocytosis in SHR CCs. However, electron microscopy did not reveal significant differences in granule size between SHRs and WKY rats' adrenal medulla. Nonetheless, preSHR and hypSHR display 63% and 82% more granules than WKY, which could explain in part the enhanced catecholamine secretion. The mechanism responsible for the heterogeneous population of prehypertensive SHR CCs and the bias towards secreting more medium and large granules remains unexplained.

**Keywords** Catecholamine secretion · Intracellular calcium · Adrenal medulla · Chromaffin cell · Hypertension · Prehypertensive stage

## Introduction

The most frequent sign of cardiovascular disease in humans is essential hypertension, which begins after a relatively long asymptomatic prehypertensive period. The disease

progresses to early hypertension between 20 and 40 years old, mainly due to increased cardiac output. Then hypertension, characterized by increased peripheral resistance, becomes established. Finally, between 40 and 60 years old, complicated hypertension arises, characterized by damage

✉ Arturo Hernández-Cruz  
ahernan@ifc.unam.mx

<sup>1</sup> Departamento Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México

<sup>2</sup> Cátedras CONACyT, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de La Fuente Muñiz, Laboratorio de Fisiología Celular, Calzada México Xochimilco No. 101, Ciudad de México 14370, México

<sup>3</sup> Unidad de Imagenología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México

<sup>4</sup> Instituto de Neurociencias, Centro Mixto Universidad Miguel Hernández-CSIC, 03550, Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain

<sup>5</sup> Laboratorio Nacional de Canalopatías, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México

to the aorta and small arteries, heart, kidneys, retina, and central nervous system.

The spontaneously hypertensive rat (SHR) strain, established in Kyoto, Japan, by selective inbreeding of the Wistar strain [34], is a prototypical animal model of essential hypertension [22, 37]. An autonomic imbalance has been suggested among the essential hypertension causal mechanisms, where the sympathetic tone surpasses the parasympathetic tone [7, 13, 20, 37]. In the SHR model, the evidence supports that both the sympathetic nervous system (SNS) and the adrenal medulla participate in hypertension's origin and maintenance [4, 6]: Sympathectomy in neonatal SHRs can delay hypertension onset, but adult blood pressure is still above age-matched WKY rats [27]. Bilateral adrenal demedullation (surgical removal of the adrenal medulla) in juvenile SHRs attenuated but did not prevent hypertension [6]. Only sympathectomy plus demedullation of juvenile SHRs prevent adult hypertension [27]. Guanethidine, which causes permanent sympathectomy without affecting adrenal chromaffin cells, lowered resting tachycardia, improved baroreflex sensitivity, and attenuated stress responses in the adult SHR [47]. However, high blood pressure reappeared, presumably, because sympathectomy is counteracted by an enhanced expression of catecholamine biosynthetic enzymes in the adrenal gland, elevated plasma adrenaline levels, and increased vascular sensitivity to catecholamines [47].

The sympathetic nervous system is hyperactive in both essential hypertension patients [3, 15] and SHRs [38]. Likewise, plasmatic catecholamine levels are higher in human patients [8, 11–13] and SHRs [20, 21]. Establishing the time course of catecholamine hypersecretion in CCs is crucial to understand hypertension's origin: It has been reported that both adrenaline (AD) and noradrenaline (NA) plasma levels are elevated in prehypertensive SHRs (5–7 weeks old). Nonetheless, after 24 weeks of age, only NA levels remain elevated, and that both AD and NA plasma levels nearly return to normotensive levels in SHR after 12 months of age [36].

Previously, we reported that membrane depolarization and caffeine application triggered  $[Ca^{2+}]_i$  elevations and catecholamine secretion 2–threefold greater in CCs from *early hypertensive* SHRs (7 to 12 weeks of age) than age-matched WKY rats CCs [39]. Since the enhanced responses of SHR CCs were suppressed by ryanodine, we concluded that the underlying mechanism is an augmented gain of the  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -release (CICR) mechanism in SHRs [39].

Some unresolved questions addressed in the study are as follows: which abnormalities from *early hypertension* can be traced to the *prehypertensive* stage? Do CCs from prehypertensive SHRs display augmented catecholamine secretion? If so, how does the hypersecretory phenotype develops in the CCs population? An increased gain of  $Ca^{2+}$ -induced

$Ca^{2+}$ -release also underlies the enhanced catecholamine exocytosis? In order to address these questions, spontaneous and stimulus-induced catecholamine exocytosis and intracellular  $Ca^{2+}$  signals were examined in CCs from prehypertensive (4–5 weeks old) and hypertensive (12 weeks old) SHRs. Also, the size and density of dense-core granules were compared with age-matched normotensive WKY CCs.

## Methods

### Animals

All experimental procedures were performed under the guidelines of the Mexican Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Secretary of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-199) and approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-IFC: protocol #AHC24-141). Eighteen male prehypertensive SHRs (*preSHR*: 4–5 weeks old) and fifteen age-matched male Wistar Kyoto (WKY) rats were used, as well as fifteen hypertensives (*hypSHR*: 12 weeks old) and twelve age-matched male WKY rats. Animals initially purchased from Charles River Labs (Wilmington, USA) have been bred and housed in our animal facility for ~2 years under temperature-control (22 °C) and a 12-h light/dark cycle. Rats received standard laboratory chow and tap water ad libitum.

### Blood pressure measurements

Animals were subject to blood pressure (BP) measurements between 10:00 a.m. and 2:00 p.m. via a non-invasive tail-cuff plethysmograph (Panlab model LE5002; Harvard Apparatus, USA). Animals were first placed into a restraining device for 10–15 min to avoid unnecessary stress during measurements. The sensing cuff was positioned on the tail base while a heating pad set to 30 °C was placed underneath. Three days prior and on the day of the animal's euthanasia, systolic and diastolic blood pressure and heart rate were measured 3–4 times over a half-hour period, and values were averaged.

### Preparation of primary cultures of chromaffin cells

Primary cultures of adrenal chromaffin cells (CCs) were performed as in [42]: Rats were anesthetized with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) i.p and sacrificed by decapitation. The adrenal glands were removed and immersed in sterile ice-cold Krebs–Ringer Bicarbonate solution (KRB) containing (in millimolar): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2  $CaCl_2$ , 1  $MgCl_2$ , 26  $NaHCO_3$ , 1.25  $NaH_2PO_4$ , and 10 glucose continuously gassed with 95%  $O_2$ –5%  $CO_2$ . Adrenal medullas were separated and incubated in  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -free

Hank's culture medium pH = 7.4 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) with 2 mg/mL collagenase type-1 (Worthington Biochem Corp., Lakewood, NJ, US) and 2 mg/mL DNase type-1 (Sigma-Aldrich) for 20 min at 37 °C. After the enzymatic digestion, glands were washed with cold KRB and triturated with a fire-polished siliconized Pasteur pipette. The cell suspension was centrifuged, and the pellet resuspended in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 5 µg/mL insulin (Sigma-Aldrich), 10,000 U penicillin, and 10 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). CCs were seeded on poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) treated glass coverslips placed in 12-well cell culture plates ( $10^3$ – $10^4$  cells per well; Costar Corning, New York, NY, USA). Cultures were maintained at 37 °C (5% CO<sub>2</sub>), and experiments were performed 24–48 h after plating.

### Recording of amperometric spikes

Recording microelectrodes were made as in [49]. A carbon fiber 10 µm in diameter was inserted in a yellow plastic pipette tip, insulated with polypropylene, and connected to the amplifier with mercury. Microelectrodes connected to the amplifier's head stage were calibrated by exposing their tip to 50 µM adrenaline (see below). Insensitive electrodes (amperometric current < 200 pA) were discarded. Cultured CCs were placed in the bottom of a plexiglass chamber attached to the stage of an upright microscope (Eclipse FNI, Nikon) equipped with a water immersion × 20 objective and continuously perfused with Krebs Ringer-HEPES solution (KRH) containing (in millimolar) 135 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, and 15 mM HEPES, and pH = 7.4 adjusted with NaOH). For amperometric current recordings, the microelectrode tip was placed gently on the CC surface, with the aid of a micromanipulator (MPC-200 Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA), and current recordings were performed with an EPC-10 amplifier under voltage-clamp mode running the PatchMaster software (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany). The electrode potential was clamped at 700 mV, and current data were acquired at 4 kHz. First, the cell under-recording remained undisturbed for 5 min. Then it was rapidly exposed to a puff of high K<sup>+</sup> solution (KCl 60 mM, NaCl 80 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, HEPES 10 mM, pH = 7.4) for 5 s delivered by a puffer pipette to depolarize the cell, activate voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels, and trigger amperometric spikes (the oxidation product of catecholamine released from a single secretory granule). In separate experiments, CCs were stimulated with a 10-s long puff of KRH solution containing 10 mM caffeine. The effects of incubating cells with ryanodine (10 µM; 10 min) were also examined. Solutions were applied through an electronic valve-controlled puffer tip located near (~ 100 µm) of

the cells under study. Recordings were performed at room temperature (22–24 °C).

### Intracellular Ca<sup>2+</sup> imaging

Coverslips with CCs were incubated with 2 µM of the cell-permeable fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator Fluo-4 AM (Molecular Probes, Life Technologies) at room temperature for 30 min. Then, the coverslip was placed in a recording chamber attached to the stage of an upright microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan) and continuously perfused (2 mL/min) with KRH solution by gravity. Fluo-4 was excited at 488 nm with an argon laser (Laser Physics, Reliant 100 s488, West Jordan, UT), coupled to a Yokogawa spin-disk confocal scan head (CSU10B, Yokogawa Electronic Co., Tokyo, Japan). Excitation light was band passed to 488 nm, and emitted fluorescence was band-passed (510 nm) before its reflection into the camera port. Fluorescence images were acquired (10 ms exposure every 500 ms) with a water-immersion, Nikon objective (× 40, 0.8 NA), and a cooled digital CCD camera (Andor Technology iXon 897, Oxford Instruments, High Wycombe, UK) controlled by the iQ software (Andor iQ version 1.10.2). Fluorescence images from unperturbed CCs perfused with KRH solution were acquired for 60 s. Then, cells were stimulated first with a 5 s-long pulse of high K<sup>+</sup> solution (KCl 60 mM), and 60 s later, by a 10-s-long caffeine application (10 mM caffeine in KRH). Fluorescence image sequences (movies) of CCs were saved in multi-tiff format and processed and analyzed with macros written in Image J version 1.38 (National Institutes of Health). Raw movies were converted to  $\Delta F$  movies:  $\Delta F = F_{(i)} - F_0$ , where  $F_0$  is the result of averaging the first five frames of the sequence, and  $F_{(i)}$  represents any (i) fluorescence image of the set. Regions of interest (ROIs) were drawn around the contour of each cell that responded to high K<sup>+</sup> with a fluorescence increase ( $SD > 5 \pm 0.5$ ). These ROIs were used for single-cell quantification of  $\Delta F$  over time. Ca<sup>2+</sup> imaging experiments were performed at room temperature (22–24 °C).

### Transmission electron microscopy

The sample preparation was as in [19] with few modifications. Adrenal glands were dissected, and 2–3 mm<sup>3</sup> tissue blocks were cut and fixed with 2.5% glutaraldehyde in a 0.2 M cacodylate buffer pH = 7.2 for 6 h at 4 °C. Then, tissue blocks were washed with cacodylate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer for 2 h at 4 °C, followed by further washing (3 × 10 min) in cacodylate buffer. The blocks were stained with 2% (v/v) uranyl acetate for 2 h. Subsequently, the samples were washed and dehydrated in an ascending ethanol series (30%, 50%, 70%, 95%; 15 min each, and then 99% ethanol twice for

15 min). Then tissue blocks were treated with propylene oxide for 30 min, embedded in epoxy resin, and polymerized for 48 h at 60 °C. Ultrathin Sects. (70 nm) were cut using a Reichert-Jung Ultracut ultramicrotome and then placed on copper grids and stained with uranyl acetate for 5 min and lead citrate for 1 min. Images were acquired using a JEOL-JEM-1200 TEM equipped with a CCD digital camera Orius GATAN.

## Data analysis and statistics

Individual amperometric spikes were analyzed using the Quanta Analysis 8.20 program running under Igor Pro software (Wavemetrics, Portland, OR, USA) [32], allowing peak detection and integration plus the calculation of kinetic parameters. The threshold to detect spikes was set at twice the standard deviation of the noise. Only spikes positive and monophasic that returned to baseline were analyzed. GraphPad Prism version 6.0 for Windows (San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis, frequency histograms, and Gaussian curve fitting.

For electron transmission analysis, we used the Image J software. The area of individual CCs within the plasma membrane boundaries, excluding the nucleus, was selected for measurements. The Image J plug-in to detected particles automatically was used. After establishing a suitable threshold, we unambiguously identified the dense core granules and measured their area. We then calculated the radius assuming circular shapes from these areas. Graphs and statistical analyses were made using GraphPad Prisma version 8.0 for Windows. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. The unpaired t-test was used, and in some cases, a one-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparison test. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was used to establish the statistical difference between the *preSHR* groups. The Kolmogorov–Smirnov test was used to compare the distribution of granules sizes in CCs. A  $p < 0.05$  was taken as a limit of significance.

## Results

### Blood pressure and heart rate

Systolic and diastolic BP values from 4–5 weeks old, prehypertensive SHRs (*preSHR*) were  $114.2 \pm 3$  and  $83 \pm 2$  mmHg (mean  $\pm$  SEM  $n = 18$  rats), respectively. Age-matched normotensive WKY rats had similar values:  $109 \pm 2$  mmHg systolic and  $80 \pm 2$  mmHg diastolic (mean  $\pm$  SEM;  $n = 15$  rats;  $p = 0.117$ ). The resting heart rate of *preSHR* and age-matched normotensive WKY rats was also similar ( $360 \pm 12$  versus  $364 \pm 15$  beats per minute; mean  $\pm$  SEM,  $p = 0.84$ ). In contrast, in

12-week-old *hypSHR* rats, systolic and diastolic BP values were  $154 \pm 3$  and  $106 \pm 4$  mmHg,  $n = 14$  rats, while in age-matched WKY rats, systolic and diastolic BP values were  $109 \pm 2$  mmHg systolic and  $80 \pm 2$  mmHg diastolic (mean  $\pm$  SEM;  $n = 12$  rats;  $p < 0.0001$ ). Accordingly, in *preSHR* rats, the heart rate was similar to age-matched WKY rats ( $360 \pm 12$  vs.  $364 \pm 15$  beats per min, mean  $\pm$  SEM;  $p = 0.84$ ), while in *hypSHR* rats, it was significantly faster than in WKY rats ( $444 \pm 10$  versus  $360 \pm 14$  beats per min; mean  $\pm$  SEM;  $p = 0.003$ ).

### Spontaneous rate of catecholamines exocytosis in *preSHR* CCs

Basal catecholamine secretion was recorded from individual cultured CCs. Only cells that responded to the stimuli (see below) were included in the analysis. Spontaneous exocytosis was present in 81.2% of WKY and 87.5% of *preSHR* CCs (Table 1, Fig. 1a, b). The total number of spontaneous spikes generated during 5 min is not significantly different (Table 1). Figure 1c shows the time course of cumulative charge (time integral) of amperometric spikes at 10-s intervals in *preSHR* and WKY CCs. After 5 min of recording, the peak cumulative charge in *preSHR* is 1.5-fold higher than in WKY CCs, but the difference is not significant ( $23.5 \pm 4.5$  pC versus  $15.1 \pm 3.2$  pC; mean  $\pm$  SEM;  $p = 0.18$ ). Of all the spike parameters measured (charge per spike, spike amplitude, half-width, number of spikes), only the charge per spike is significantly larger in *preSHR* CC (1.5-fold; Table 1). Amplitude distribution histograms of spontaneous amperometric spikes are shown in Fig. 1d. Their analysis revealed that large spikes (190–290 pA) tend to occur more often in *preSHR* than in WKY CCs (Table 2).

### Spontaneous rate of catecholamines exocytosis in *hypSHR* CCs

Figures 1e and f illustrate representative amperometric recordings from *hypSHR* and age-matched WKY CCs. Figure 1g shows the time course of the cumulative charge in both strains. After 5-min recording, the peak cumulative charge is 1.5-fold larger in *hypSHR* than in WKY CCs ( $21.1 \pm 3.5$  pC versus  $14.2 \pm 3.5$  pC; mean  $\pm$  SEM;  $p = 0.19$ ). This difference is not significant (Table 1), although the charge per spike and spike amplitude are significantly larger in *hypSHR* CCs (Table 1; see the “Discussion” section). The amplitude distribution histograms of spontaneous amperometric spikes shown in Fig. 1h gives that medium (50–190 pA) and large spikes (190–290 pA) are more frequent in *hypSHR* than in WKY CCs (Table 2).



**Table 1** Kinetic parameters of amperometric spikes recorded from CCs of pre-hypertensive and hypertensive SHR (4–5 weeks and 12 weeks respectively) in comparison with age-matched normoten-sive WKY rats. Data are mean  $\pm$  SEM. *n* indicates the number of cells. \**p* < 0.05. Unpaired *t*-test. One-way ANOVA after Dunnett's post hoc test

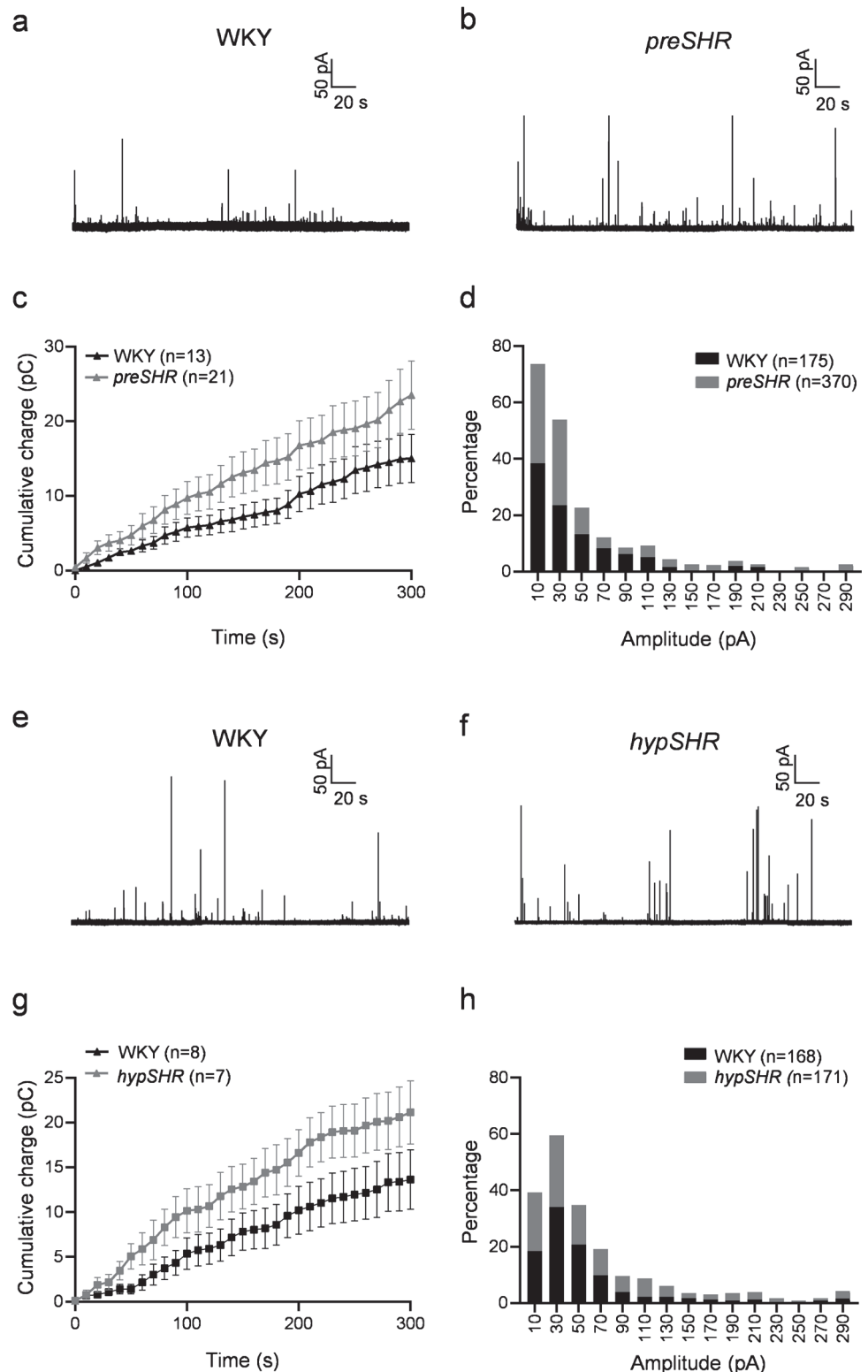
Spontaneous	Active cells %	Cumulative charge (pC)	Charge/spike (pC)	Spike Amplitude (pA)	Half-width $t_{1/2}$ (ms)	Number of spikes recorded	
WKY (4–5 w; <i>n</i> = 13)	81.2	15.1 $\pm$ 3.2	0.70 $\pm$ 0.06	43.8 $\pm$ 3.1	10.4 $\pm$ 0.7	13.4 $\pm$ 1.6	
<i>preSHR</i> (4–5 w; <i>n</i> = 21)	87.5	23.5 $\pm$ 4.5 ( <i>p</i> = 0.18)	1.08 $\pm$ 0.05* ( <i>p</i> = 0.002)	51.7 $\pm$ 2.9 ( <i>p</i> = 0.09)	11.6 $\pm$ 0.4 ( <i>n</i> = 0.17)	17.6 $\pm$ 2.6 ( <i>p</i> = 0.22)	
WKY (12 w; <i>n</i> = 8)	80	14.2 $\pm$ 3.5	0.67 $\pm$ 0.04	58.1 $\pm$ 4.1	8.6 $\pm$ 0.6	21.0 $\pm$ 4.7	
<i>hypSHR</i> (12 w; <i>n</i> = 7)	77.7	21.1 $\pm$ 3.5 ( <i>p</i> = 0.19)	0.88 $\pm$ 0.05* ( <i>p</i> = 0.003)	76.4 $\pm$ 5.8* ( <i>p</i> = 0.01)	7.2 $\pm$ 0.4 ( <i>p</i> = 0.06)	24.4 $\pm$ 5.6 ( <i>p</i> = 0.64)	
Depolarization	Latency to first spike (sec)	Cumulative charge (pC)	Charge/spike (pC)	Spike amplitude (pA)	Half-width $t_{1/2}$ (ms)	Number of spikes	Burst duration (sec)
WKY (4–5 w; <i>n</i> = 16)	1.1 $\pm$ 0.23	21.3 $\pm$ 2.3	0.68 $\pm$ 0.06	46.2 $\pm$ 2.1	9.7 $\pm$ 0.3	33.0 $\pm$ 4.8	20
<i>preSHR</i> (4–5 w; <i>n</i> = 24)	1.4 $\pm$ 0.18 ( <i>p</i> = 0.75)	61.8 $\pm$ 2.7* ( <i>p</i> = 0.0009)	0.97 $\pm$ 0.02* ( <i>p</i> < 0.0001)	66.8 $\pm$ 2.9* ( <i>p</i> < 0.0001)	11.6 $\pm$ 0.2* ( <i>p</i> < 0.0001)	57.8 $\pm$ 7.8* ( <i>p</i> = 0.03)	38
Subgroup 1 ( <i>n</i> = 12)	1.5 $\pm$ 0.30 ( <i>p</i> = 0.54)	23.69 $\pm$ 1.5 ( <i>p</i> = 0.99)	0.73 $\pm$ 0.03 ( <i>p</i> = 0.93)	48.3 $\pm$ 2.7 ( <i>p</i> = 0.99)	10.1 $\pm$ 0.4 ( <i>p</i> = 0.76)	32.5 $\pm$ 4.2 ( <i>p</i> = 0.66)	31
Subgroup 2 ( <i>n</i> = 7)	1.2 $\pm$ 0.18 ( <i>p</i> = 0.99)	71.7 $\pm$ 9.0* ( <i>p</i> = 0.001)	0.86 $\pm$ 0.03* ( <i>p</i> = 0.04)	51.4 $\pm$ 2.3 ( <i>p</i> = 0.78)	11.9 $\pm$ 0.2* ( <i>p</i> < 0.0001)	69.2 $\pm$ 15.7* ( <i>p</i> = 0.03)	35
Subgroup 3 ( <i>n</i> = 5)	1.3 $\pm$ 0.31 ( <i>p</i> = 0.98)	127.3 $\pm$ 10.1* ( <i>p</i> < 0.0001)	1.28 $\pm$ 0.06* ( <i>p</i> < 0.0001)	110.7 $\pm$ 8.8* ( <i>p</i> < 0.0001)	12.5 $\pm$ 0.4* ( <i>p</i> < 0.0001)	105.2 $\pm$ 10.1* ( <i>p</i> < 0.0001)	20
WKY (12 w; <i>n</i> = 10)	0.91 $\pm$ 0.23	25.9 $\pm$ 4.8	0.91 $\pm$ 0.04	74.4 $\pm$ 4.7	9.5 $\pm$ 0.3	29.1 $\pm$ 5.8	20
<i>hypSHR</i> (12 w; <i>n</i> = 9)	1.20 $\pm$ 0.17 ( <i>p</i> = 0.35)	71.7 $\pm$ 10.3* ( <i>p</i> = 0.0008)	1.2 $\pm$ 0.04* ( <i>p</i> = 0.001)	115.9 $\pm$ 6.1* ( <i>p</i> < 0.0001)	8.1 $\pm$ 0.2* ( <i>p</i> = 0.003)	57.7 $\pm$ 6.2* ( <i>p</i> = 0.007)	35
Caffeine							
WKY (4–5 w; <i>n</i> = 9)	3.2 $\pm$ 0.65	10.8 $\pm$ 1.5	0.51 $\pm$ 0.03	39.5 $\pm$ 2.4	7.6 $\pm$ 0.4	20.8 $\pm$ 2.1	6–8
<i>preSHR</i> (4–5 w; <i>n</i> = 9)	3.4 $\pm$ 1.1	20.3 $\pm$ 3.6* ( <i>p</i> = 0.01)	0.68 $\pm$ 0.04* ( <i>p</i> = 0.012)	46.9 $\pm$ 2.7* ( <i>p</i> = 0.04)	10.5 $\pm$ 0.4* ( <i>p</i> < 0.0001)	28.3 $\pm$ 4.8 ( <i>p</i> = 0.15)	6–8

### Depolarization-induced catecholamines exocytosis from *preSHR* CCs

A brief application of a depolarizing solution triggers robust  $Ca^{2+}$ -mediated exocytosis in CCs [7]. To characterize this secretory response, amperometric recordings from 4 to 5 weeks old *preSHRs* CCs and age-matched WKY rats were compared. As shown in Fig. 2 a and b, the amperometric responses of *preSHR* CCs are more robust and longer-lasting than WKY CCs. Recordings from three different *preSHR* CCs are shown in Fig. 2b. The latency between the stimulus onset and the first amperometric spike *preSHR* CCs and WKY is similar (1.4  $\pm$  0.18 s versus 1.1  $\pm$  0.23 s; mean  $\pm$  SEM; *p* = 0.75; see Table 1).

Figure 2c compares the time course of cumulative charge at 2-s intervals. After 60 s of recording, the peak cumulative charge is 2.9-fold greater in *preSHR* than in WKY CCs. Likewise, all spike parameters, namely: charge per spike, spike peak amplitude, half-width, and the total number of spikes, were significantly greater in *preSHR* than in WKY CCs (Table 1). Figure 2e compares the amplitude distribution of depolarization-induced amperometric spikes from CCs of both strains. The mean spike amplitude of *preSHR* is significantly larger than WKY CCs (66.8  $\pm$  2.9 versus 46.2  $\pm$  2.1 pA; mean  $\pm$  SEM; *p* < 0.0001). More medium (50–190 pA) and large spikes (190–290 pA) were recorded from *preSHR* than WKY CCs (Table 2). These results demonstrate that CCs from *preSHRs* display more vigorous catecholamine secretion in response to membrane depolarization than WKY CCs.

**Fig. 1** Spontaneous catecholamine exocytosis from single cultured *preSHR* and *hypSHR* chromaffin cells (CCs). **a, b** Representative amperometric recordings from a WKY (**a**) and a *preSHR* (**b**) CCs. **c** Time course of cumulative charge at 10-s intervals for WKY (black triangles) and *preSHR* (gray triangles; parenthesis: number of cells analyzed, from 3 different cultures) CCs. After 5 min of recording, the peak cumulative charge in *preSHR* is 1.5-fold higher than in WKY CCs. **d** Amplitude distribution histograms of spontaneous amperometric spikes recorded from WKY (black bars) and *preSHR* (gray bars) CCs. Large spikes (190–290 pA) occurred more often in *preSHR* CCs than in WKY CCs (parenthesis: total number of spikes analyzed). **e, f** Representative amperometric recordings from a WKY CC (**e**) and a *hypSHR* CC (**f**). **g** Time course of cumulative charge at 10-s intervals in *hypSHRs* (gray squares) and WKY CCs (black squares; parenthesis: number of cells analyzed from 3 different cultures). **h** Amplitude distribution histograms of spontaneous amperometric spikes recorded from WKY CCs (black bars) and *hypSHR* CCs (gray bars). Medium and large spikes are recorded more often in *preSHR* CCs than in WKY CCs (see Table 2)



The peak cumulative charge data of CCs from *preSHRs* ( $n=24$  cells) showed more variability than WKY CCs (Fig. 2c). Hence, we arbitrarily divided the *preSHR* data into three *subgroups* according to their peak cumulative charge: *subgroup 1*

(12/24): CCs with peak cumulative charge comparable to WKY CCs ( $p=0.99$ ); *subgroup 2* (7/24): CCs with peak cumulative charge ~threefold larger than WKY CCs ( $p=0.001$ ); *subgroup 3* (5/24): CCs with peak cumulative charge ~sixfold larger than

**Table 2** Percentages of small (0–50 pA), medium (50–190 pA), and large (190–290 pA) amperometric spikes recorded from *preSHR*, *hypSHR*, and age-matched WKY CCs. Data are mean  $\pm$  SEM. *n* indicates the number of spikes \**p*<0.05

Strain (age)	Spontaneous				Mean spike amplitude
	Small %	Medium %	Large %		
WKY (4–5 w) <i>n</i> = 175	62.0	34.3	3.7	43.8 $\pm$ 3.1	
<i>preSHR</i> 4–5 w <i>n</i> = 370	65.4	27.4	7.2	51.7 $\pm$ 2.9 ( <i>p</i> = 0.09)	
WKY (12 w) <i>n</i> = 168	56.3	36.9	6.8	58.1 $\pm$ 4.1	
<i>hypSHR</i> (12 w) <i>n</i> = 171	47.5	43.5	9.0	76.4 $\pm$ 5.8* ( <i>p</i> = 0.01)	
	Depolarization				Mean spike amplitude
	Small %	Medium %	Large %		
WKY (4–5 w) <i>n</i> = 528	64.3	32.2	3.5	46.2 $\pm$ 2.1	
<i>preSHR</i> (4–5 w) <i>n</i> = 1387	57.2	35.8	7.0	66.8 $\pm$ 2.9* ( <i>p</i> < 0.0001)	
WKY (12 w) <i>n</i> = 291	38.8	53.8	7.4	74.4 $\pm$ 4.7	
<i>hypSHR</i> (12 w) <i>n</i> = 529	33.4	50.1	16.5	115.9 $\pm$ 6.1* ( <i>p</i> < 0.0001)	
	Caffeine				Mean spike amplitude
	Small %	Medium %	Large %		
WKY (4–5 w) <i>n</i> = 188	69.9	28.8	1.3	39.5 $\pm$ 2.4	
<i>preSHR</i> (4–5 w) <i>n</i> = 255	65.2	33.3	1.5	46.9 $\pm$ 2.7 ( <i>p</i> = 0.004)	

WKY CCs (*p* < 0.0001). Figure 2b exemplifies an amperometric recording from each group, and Fig. 2d compares the time courses of cumulative charge.

The latency to the first amperometric spike in *subgroup 1* is longer than in WKY CCs (1.5  $\pm$  0.3 s versus 1.1  $\pm$  0.2 s; mean  $\pm$  SEM; *p* = 0.75; see Table 1), but the difference is not significant. Likewise, all the spike parameters (peak cumulative charge, charge per spike, peak amplitude, the total number of spikes) of *subgroup 1* are very similar to age-matched WKY CCs. In contrast, the spike parameters of *subgroups 2* and *3* (except for spike amplitude in *subgroup 2*) have values significantly greater than WKY CCs (Table 1). The differences among *subgroups 2* and *3* are also significant. In particular, the cumulative charge, the charge per spike, and the spike amplitude of CCs from *subgroup 3* are 1.7, 1.4, and 2.1-fold greater than those of *subgroup 2* (Table 1). From these results, it can be concluded that the secretion rate of CCs from *subgroup 1* is almost indistinguishable from age-matched WKY CCs, while CCs from *subgroups 2* and *3* can be characterized as *super-secretory* and *hyper-secretory*, respectively (see Fig. 2d and Table 1).

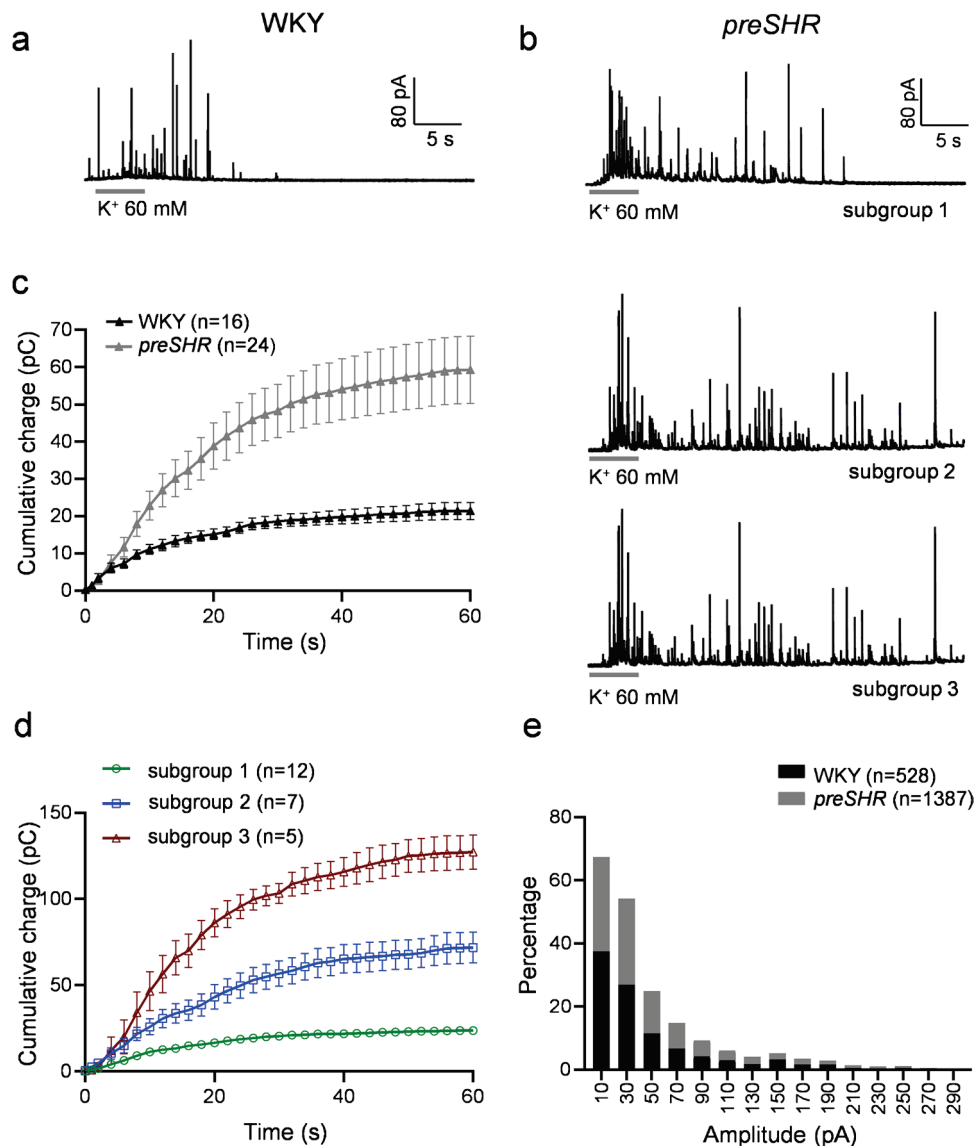
### Depolarization-induced catecholamine exocytosis in *hypSHR* CCs

Next, we compared depolarization-induced catecholamine secretion of CCs from *hypSHR* versus age-matched WKY CCs. Representative amperometric recordings are shown in Fig. 3a and b. Figure 3c compares the time course of cumulative charge from these two strains. After 60 s of recording, the peak cumulative charge of *hypSHR* is ~2.8-fold higher than age-matched

WKY CCs (Table 1). Accordingly, the spike parameters of *hypSHR* (except the number of spikes) are between 1.3- and 2.0-fold bigger in *hypSHR* than WKY CCs (Table 1). The amplitude distributions of depolarization-induced amperometric spikes recorded from CCs of *hypSHR* and WKY are shown in Fig. 3d. The difference in mean spike amplitude between *hypSHR* and WKY CCs (115.9  $\pm$  6.1 pA versus 74.4  $\pm$  4.7 pA; mean  $\pm$  SEM; *p* < 0.0001) may be explained by a more significant proportion of large spikes (190–290 pA), and fewer medium (50–190 pA) and small spikes (0–50 pA) in *hypSHR*s CCs (Table 2).

### Caffeine-induced release of catecholamines from *preSHR* CCs

Caffeine was applied to assess the contribution of Ca<sup>2+</sup> release from the endoplasmic reticulum (ER) to catecholamine exocytosis (see “Methods” section). When the ER contains enough Ca<sup>2+</sup>, caffeine opens RyRs, producing an [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise that triggers robust catecholamine exocytosis [18, 19, 28]. In contrast to membrane depolarization, where the first exocytotic events occur after a brief delay (< 1.5 s), the caffeine-induced response begins after a significantly longer delay (3.2  $\pm$  0.6 s and 3.4  $\pm$  1.1 s; mean  $\pm$  SEM; WKY and *preSHR* CCs, respectively) and comprises a bump-like elevation above baseline with a burst of amperometric spikes riding on top [30]. Both components ceased after approximately 10 s, although slow spiking may continue after 50 s or more (Fig. 4a, b). Figure 4c compares the time course of the cumulative charge of each strain. After 60 s of caffeine application, the



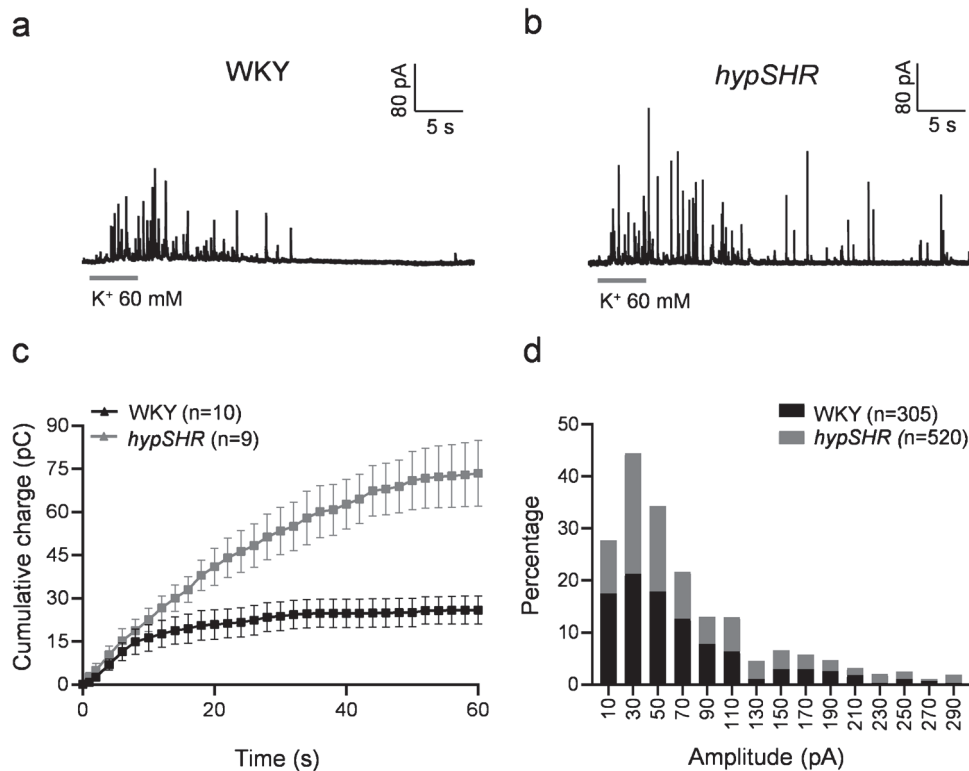
**Fig. 2** Catecholamine exocytosis elicited by high  $K^+$  depolarization in WKY and *preSHR* chromaffin cells. **a**, **b** Representative amperometric recordings from a WKY CC (**a**) and three *preSHR* CCs belong to subgroups 1, 2, and 3 (**b**). The response to membrane depolarization is more robust in subgroups 2 and 3 (see explanation in the text). **c** Time course of the cumulative charge at 2-s intervals for WKY (black triangles) and *preSHR* (gray triangles) CCs. After 60 s of recording, the peak cumulative charge is 2.8-fold greater in *preSHR* than in WKY CCs. **d** Time course of the cumulative charge at 2-s intervals after the depolarizing stimulus for the three subgroups

peak cumulative charge is nearly 1.9-fold greater in *preSHR* than in WKY CCs (Table 1; see also [39]). Accordingly, all spike parameters of caffeine-induced exocytosis (except the number of spikes) were significantly augmented in *preSHR* CCs compared to WKY CCs (Table 2). Figure 4d compares the amplitude distribution of caffeine-induced amperometric spikes. Medium (50–190 pA) and large (190–290 pA) spikes occurred more often in *preSHR*

of *preSHR* CCs (green circles: subgroup 1; blue squares: subgroup 2; red triangles: subgroup 3. (parentheses: number of spikes analyzed in 5 different cultures). The peak cumulative charge of subgroup 1 is identical to WKY CCs ( $p=0.99$ ), while that of subgroups 2 and 3 are 3.0-fold and 6.0-fold larger than WKY CCs ( $p=0.001$  and  $p<0.0001$ , respectively).  $*p<0.05$ , one-way ANOVA after Dunnett's post hoc test. **e** Amplitude distribution histograms of amperometric spikes recorded from WKY CCs (black bars) and *hypSHR* CCs (gray bars). Medium and large spikes arose more often in *preSHR* CCs than in WKY CCs (see Table 2; parenthesis: number of spikes analyzed)

CCs than in WKY CCs (Table 2). These data agree with an earlier study in CC from SHRs with early hypertension [39] (see the “Discussion” section).





**Fig. 3** Catecholamine exocytosis elicited by high  $K^+$  depolarization in WKY and *hypSHR* chromaffin cells. **a, b** Representative amperometric recordings from a WKY CC (**a**) and a *hypSHR* CC (**b**). The response to membrane depolarization is more robust in *hypSHR* than in WKY CC. **c** Time course of the cumulative charge at 2-s intervals for WKY (black triangles) and *hypSHR* CCs (gray triangles). The parenthesis: the number of cells analyzed from 3 different cultures).

After 60 s of recording, the peak cumulative charge is 2.7-fold greater in *hypSHR* CC than in WKY CCs. **d** Amplitude distribution histograms of amperometric spikes, recorded from WKY (black bars) and *hypSHR* CCs (gray bars). Medium and large spikes appear more often in *hypSHR* CCs than in WKY CCs (see Table 2; parenthesis: number of cells analyzed). \* $p < 0.05$ , unpaired  $t$ -test

### Contribution of CICR to depolarization-induced exocytosis in *preSHR*

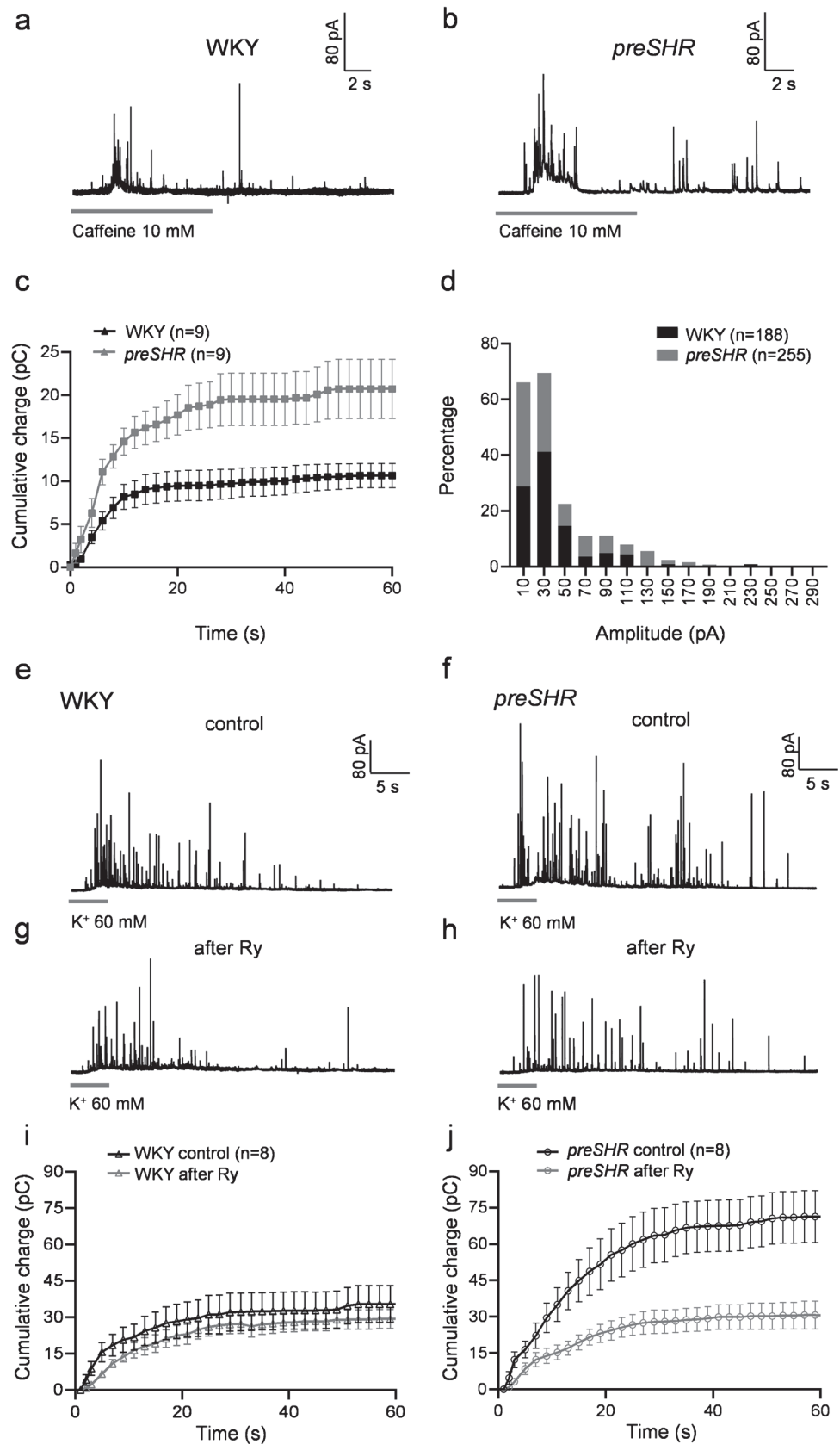
Next, we investigated the contribution of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -release (CICR) to exocytosis in *preSHR* CCs. Depolarization-induced amperometric spikes were recorded from WKY and *preSHR* CCs before and after 10-min incubation with 10  $\mu$ M ryanodine (an irreversible RyR blocker). CCs from both strains produce fewer spikes after ryanodine incubation, but the reduction is stronger in *preSHR* CC (Fig. 4e–h). Figure 4i and Figure 4j illustrate the time course of cumulative charge in these two strains before and after ryanodine treatment. The peak cumulative charge diminished by  $\sim 14\%$  in WKY CCs and  $\sim 57\%$  in *preSHR* CCs (see Table 3). None of the amperometric spike parameters of WKY CCs were significantly altered by ryanodine. Conversely, in *preSHR* CCs, the charge per spike, spike amplitude half-width, and the number of spikes diminished significantly (Table 3). Since ryanodine blocks RyR-mediated CICR [23, 48], these data demonstrate that CICR contributes

more significantly to catecholamine secretion in *preSHR* than in WKY CCs ([39], see the “Discussion” section).

### Intracellular $Ca^{2+}$ signals in *preSHR* CCs

Our previous study in CC from early hypertensive SHR [39] showed that the augmented stimulus-induced secretory response correlates with the generation of stronger intracellular  $Ca^{2+}$  signals. Hence, we wondered if the same mechanism underlies the enhanced catecholamine secretion in *preSHR* CCs. Cultures were incubated with a fluorescent  $Ca^{2+}$  indicator, and time series of fluorescence images ( $\Delta F$  movies) was captured after stimulation, first with high  $K^+$  and then with caffeine (see the “Methods” section). Figure 5a exemplifies  $\Delta F$  signals (arbitrary units; a. u.) elicited by membrane depolarization in a WKY and a *preSHR* CC. Figure 5b compares the mean peak  $\Delta F$  amplitudes. The depolarization-induced  $\Delta F$  signals are significantly stronger in *preSHR* ( $88.2 \pm 4.1$  a.u.; mean  $\pm$  SEM;  $n = 96$  cells) than in WKY CCs ( $58.1 \pm 3.4$  a.u., mean  $\pm$  SEM;  $n = 89$  cells);  $p < 0.0001$ . Figure 5c illustrates caffeine-induced  $\Delta F$  signals

**Fig. 4** Contribution of Calcium-induced Calcium release to catecholamine exocytosis from *preSHR* and WKY CCs. **a, b** Representative amperometric responses elicited by caffeine application (10 mM, 10 s) from a WKY (**a**) and a *preSHR* (**b**) CC. A more robust secretory response is recorded in *preSHR*. **c** Time course of cumulative charge at 2-s intervals for WKY (black squares) and *preSHR* CCs (gray squares). At 60 s, the peak cumulative charge is 2.0-fold greater in *preSHR* than in WKY CCs. **d** Amplitude distribution histograms of caffeine-induced amperometric spikes recorded from WKY (black bars) and *preSHR* CCs (gray bars). Medium and large spikes are more frequent in *preSHR* CCs than in WKY CCs (Table 2; parenthesis: number of cells analyzed from 5 different cultures). **e, f** Representative traces of depolarization-induced amperometric spikes from a WKY CC and a *preSHR* CC. **g, h** Corresponding traces obtained from the same pair of cells after incubation with ryanodine (10  $\mu$ M; 10 min). Ryanodine affects more the secretory response of *preSHR* than WKY CC. **i, j** Time course of cumulative charge at 2-s intervals for WKY and *preSHR* CCs responses, before (black circles) and after (gray circles) ryanodine treatment. In WKY CCs, the peak cumulative charge did not change significantly after ryanodine treatment ( $p=0.83$ ; see Table 3), while it dropped by 57% in *preSHR* CCs ( $p=0.01$ , see Table 3). The parenthesis is the number of cells analyzed from 3 different cultures). \* $p < 0.05$ , one-way ANOVA after Tukey's post hoc test



**Table 3** Kinetic parameters of amperometric spikes recorded from age-matched WKY CCs and pre-hypertensive SHR CCs before and after incubation with 10  $\mu$ M ryanodine. Data are mean  $\pm$  SEM. *n*indicates the number of cells from three different cultures. \*  $p < 0.05$  compared to control before ryanodine treatment, One-way ANOVA after Tukey's post hoc test

	Cumulative charge (pC)	Charge/spike (pC)	Spike amplitude (pA)	Half-width $t_{1/2}$ (ms)	Number of spikes
<b>WKY (4–5 w; <i>n</i> = 8)</b>					
Control	35.4 $\pm$ 7.6	0.79 $\pm$ 0.03	69.9 $\pm$ 3.9	8.1 $\pm$ 0.3	39.8 $\pm$ 9.9
Ryanodine 10 $\mu$ M	30.3 $\pm$ 3.9 ( <i>p</i> = 0.49)	0.77 $\pm$ 0.04 ( <i>p</i> = 0.71)	67.4 $\pm$ 3.5 ( <i>p</i> = 0.60)	8.3 $\pm$ 0.3 ( <i>p</i> = 0.76)	32.4 $\pm$ 6.9 ( <i>p</i> = 0.55)
<b>preSHR (4–5 w; <i>n</i> = 8)</b>					
Control	71.3 $\pm$ 10.6	0.98 $\pm$ 0.03	79.3 $\pm$ 2.8	8.2 $\pm$ 0.4	69.4 $\pm$ 6.5
Ryanodine 10 $\mu$ M	30.6 $\pm$ 5.7* ( <i>p</i> = 0.005)	0.84 $\pm$ 0.05* ( <i>p</i> = 0.04)	58.8 $\pm$ 3.6* ( <i>p</i> = 0.0009)	10.2 $\pm$ 0.5* ( <i>p</i> = 0.006)	33.4 $\pm$ 4.7* ( <i>p</i> = 0.0007)

in CCs from both strains, and Fig. 5d compares the mean peak  $\Delta F$  amplitudes, caffeine-induced  $\Delta F$  signals are significantly stronger in *preSHR* (46.6  $\pm$  4.0; mean  $\pm$  SEM; *n* = 96 cells) than in WKY CCs (34.1  $\pm$  2.7 a.u.; mean  $\pm$  SEM; *n* = 89 cells);  $p = 0.001$ .

### Intracellular $Ca^{2+}$ signals in *hypSHR* CCs

Figure 5e compares depolarization-induced  $\Delta F$  signals recorded from a *hypSHR* and age-matched WKY CCs. The corresponding mean peak  $\Delta F$  amplitudes are shown in Fig. 5f. The depolarization-induced  $\Delta F$  signals in *hypSHR* (100.4  $\pm$  6.8 a.u.; mean  $\pm$  SEM; *n* = 73 cells) are significantly stronger than those of WKY CCs (56.9  $\pm$  3.7 a.u. mean  $\pm$  SEM; *n* = 82 cells;  $p < 0.0001$ ). The  $\Delta F$  signals elicited in the same CCs by caffeine application are shown in Fig. 5g, and the mean peak amplitudes are illustrated in Fig. 5h. The caffeine-induced  $\Delta F$  signals are stronger in *hypSHR* (53.5  $\pm$  3.6 a.u., mean  $\pm$  SEM, *n* = 73 cells) in than in WKY CCs (34.6  $\pm$  5.7 a.u.; mean  $\pm$  SEM, *n* = 82 cells;  $p = 0.002$ ). As these data demonstrate, *hypSHR* CCs produce slightly stronger  $[Ca^{2+}]_i$  signals than *preSHR* CCs in response to the same stimulus: 100.4 a.u. versus 88.2 a.u. for depolarization and 53.5 a.u. versus 46.6 a.u. for caffeine (see the “Discussion” section).

### Comparison of dense-core granules between *preSHR*, *hypSHR*, and WKY CCs

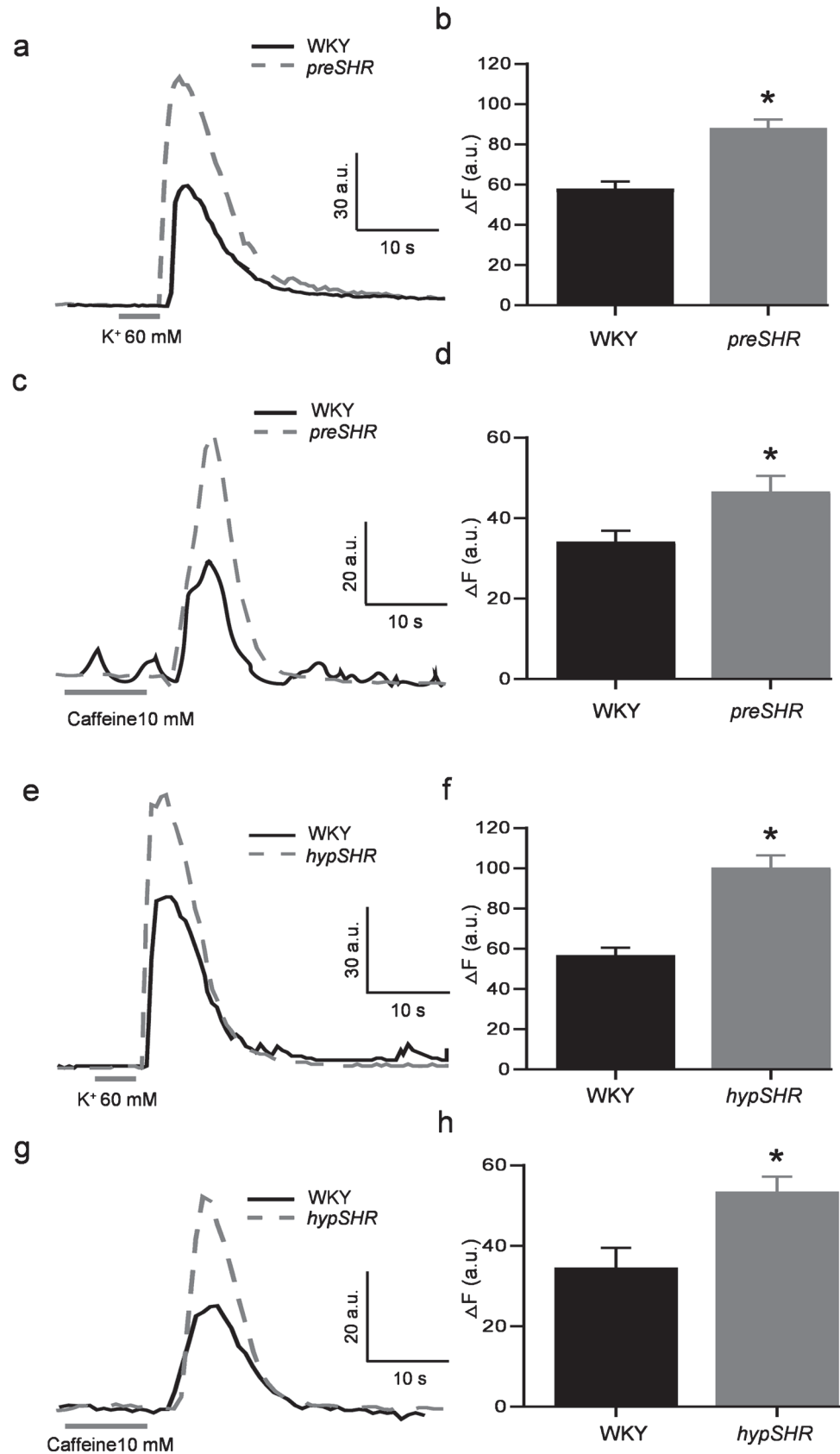
Both spontaneous and stimulated exocytosis of catecholamines from *preSHR* and *hypSHR* CCs comprises amperometric spikes with a mean charge per spike 1.5 and 1.2-fold larger respectively than age-matched WKY CCs (Table 1). Since SHR's spikes transport more charge (catecholamines) than WKYs, they represent the exocytosis of larger secretory granules [see 42]. In order to test the hypothesis that SHR contains bigger secretory granules than WKY CCs, sections of adrenal glands from *preSHR*, *hypSHR*, and aged-matched WKY were examined by TEM.

Figures 6a–d illustrate TEM images from *preSHR* and WKY sections at two different magnifications. No differences in granule size can be observed. Dense-core granules were detected, and their areas were measured and transformed to diameters (see the “Methods” section). The mean granule diameter does not differ between *preSHR* and WKY CCs (Fig. 6e), and the granule size distributions are similar in both strains (Fig. 6g and Table 4). Figure 7a–d illustrates TEM images from *hypSHR* and age-matched WKY. Once again, no difference in granule size is noticeable, and the mean granule diameter does not differ significantly between *hypSHR* and WKY CCs (Fig. 7e). Accordingly, the granule size distributions are also very similar between strains (Fig. 7g and Table 4). Nonetheless, when Fig. 6a and 6b and Fig. 7a and b are compared, it is obvious that the cytoplasm of *preSHR* and *hypSHR* CCs contains more granules than that of WKY CCs. The granule density per cytoplasmic area was measured (see the “Methods” section). As shown in Figs. 6f and 7f, the difference is significant: *preSHR* and *hypSHR* have 63% and 82% more granules respectively than WKY (see Table 4).

## Discussion

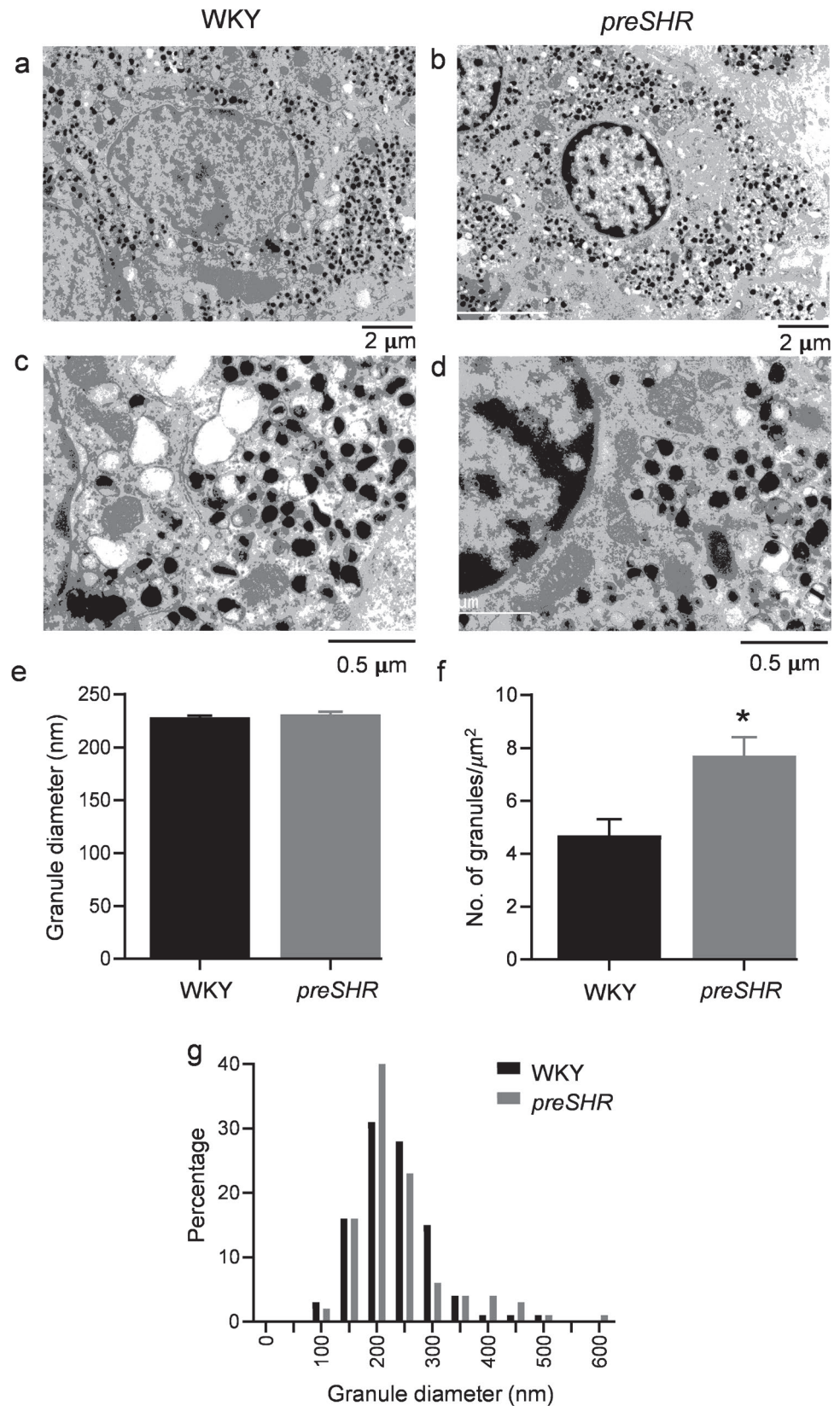
Neonatal and infantile SHR are normotensive. After 6 weeks of age, blood pressure (BP) gradually rises [24], reaching 150 mmHg by the 10<sup>th</sup> week. At this early stage (hyperkinetic phase of hypertension), high BP results from the augmented cardiac output, with total peripheral resistance (TPR) unchanged [27]. By the 15th week, BP reaches 200 mmHg [24], with TRP remaining unchanged. At 25 weeks of age (TRP phase of hypertension [10]), high BP concurs with increased TPR, with cardiac output returning to normal [40]. During the TRP phase, edema, cardiac hypertrophy, and kidney failure are common [10]. In juvenile SHRs (5–7 weeks old), adrenaline (A) and noradrenaline (NA) plasma levels are elevated. After 24 weeks of age, only NA remains elevated, and by 12 months of age, both AD and NA nearly

**Fig. 5** Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in response to membrane depolarization and caffeine application in *preSHR* and *hypSHR* CCs. **a** Examples of  $\Delta F$  signals elicited by high- $\text{K}^+$  depolarization in a WKY (solid line) and a *preSHR* (dashed line) CC. **b**: Bar plot of the amplitude of depolarization-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in WKY (black bar) and *preSHR* CCs (gray bar). The mean peak fluorescence signal is 1.5-fold larger in *preSHR* than in WKY CCs ( $p < 0.0001$ ). **c**: Examples of  $\Delta F$  signals elicited by caffeine application (10 mM, 10 s) in a WKY (solid line) and a *preSHR* (dashed line) CC. Recordings are from the same pair of CCs shown in **a** and **c**. **d** Bar plot comparing the amplitude of caffeine-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in WKY (black bar) and *preSHR* CCs (gray bar). The mean peak  $\Delta F$  signals are 1.4-fold larger in *preSHR* than in WKY CCs ( $p = 0.001$ ). Number of cells: *preSHR* ( $n = 96$ ) and WKY ( $n = 89$ ) from 4 different cultures for each strain. **e** Representative  $\Delta F$  signals elicited by high- $\text{K}^+$  depolarization in a WKY (solid line) and a *hypSHR* (dashed line) CC. **f** Bar plot comparing the amplitude of depolarization-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in WKY (black bar) and *hypSHR* CCs (gray bar). On average, the peak  $\Delta F$  signals are 1.8-fold larger in *hypSHR* than in WKY CCs ( $p < 0.0001$ ). **g** Representative  $\Delta F$  signals elicited by caffeine in a WKY (solid line) and a *hypSHR* CC (dashed line). **h** Bar plot comparing the amplitude of caffeine-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in WKY (black bar) and *hypSHR* CCs (gray bar). On average, peak  $\Delta F$  signals are 1.5-fold larger in *hypSHR* than in WKY CCs ( $p = 0.002$ ). Number of cells: *hypSHR* ( $n = 73$ ); WKY ( $n = 82$  cells) from 4 different cultures for each strain. \* $p < 0.05$ , unpaired *t*-test





**Fig. 6** Comparison of dense-core granules in WKY and *preSHR* CCs. **a, b** Representative electron micrographs from WKY (**a**) and *preSHR* adrenal gland (**b**). **c, d** electron micrographs from WKY (**c**) and *preSHR* adrenal gland (**d**) at higher magnification. **e**: Bar plot of the diameter of dense-core granules from WKY (black bar) and *preSHR* (gray bar) ( $228 \pm 2$  nm and  $231 \pm 2$ , respectively,  $p=0.25$ ). **f** Bar plot of the density of granules per unit area in WKY (black bar) and *preSHR* (gray bar) ( $4.7 \pm 0.6$  versus  $7.7 \pm 0.7$  granules/ $\mu\text{m}^2$  respectively,  $p=0.01$ ); unpaired *t*-test. **g** Frequency histogram of granule size in WKY (dark bars) and *preSHR* (gray bars). Granule size distributions are very similar, with most granules (75.2% of *preSHR* and 76.6% of WKY) ranging between 200 and 400 nm (*preSHR*  $n=1593$  granules; WKY  $n=1225$ ). Our data set comprises 15 EM pictures of 4-week-old *preSHR*, and 10 EM pictures of age-matched WKY rats ( $n=3$  rats from each strain)



**Table 4** Granule size data from TEM of adrenal sections from *preSHR*, *hypSHR*, and age-matched WKY CCs. Data are mean  $\pm$  SEM. The *n* indicates the number of granules measured. \* $p < 0.05$ , unpaired *t*-test. Our data set comprises 15 EM pictures of 4-week-old *preSHR*,

and 10 EM pictures of age-matched WKY rats; 15 EM pictures of 12-week-old *hypSHR*, and 10 EM pictures of age-matched WKY rats ( $n = 3$  rats from each strain)

Strain	% Small < 200 nm	% Medium (200–400 nm)	% Large (400–600 nm)	Mean granule size (nm)	Mean granule density (granules/ $\mu\text{m}^2$ )
WKY (4–5 w) $n = 1225$	20.1	76.6	3.2	231 $\pm$ 2	4.7 $\pm$ 0.6
<i>preSHR</i> (4–5 w) $n = 1593$	17.4	75.2	7.7	228 $\pm$ 2 ( $p = 0.25$ )	7.7 $\pm$ 0.7 ( $p = 0.01$ )
WKY (12 w) $n = 1298$	31.9	54.3	13.8	233 $\pm$ 3	4.5 $\pm$ 0.7
<i>hypSHR</i> (12 w) $n = 2170$	18.1	72.6	9.3	235 $\pm$ 2 ( $p = 0.64$ )	8.2 $\pm$ 0.6 ( $p = 0.001$ )

return to normal [36]. Thus, the early hyperkinetic phase of hypertension correlates with increased catecholamine secretion, but the late TRP phase does not.

Sympathectomy of neonatal SHR results in adults with lower BP but still higher than WKY rats [25]. Likewise, bilateral adrenal demedullation attenuates adult hypertension. Only sympathectomy plus demedullation of immature SHR prevents the development of hypertension [24]. Hence, the sympathetic nervous system and the adrenal medulla play synergistic roles in BP elevation of SHR. This study hypothesis is that hypertension onset is associated with an early elevation of plasmatic catecholamines, likely originated from the adrenal gland. A relevant question would be: Which abnormalities of the adult SHR can be traced to the prehypertensive stage? The answer to this question is crucial for the design of early intervention therapeutic strategies.

### Prehypertensive stage alterations

Plasma levels of catecholamines and neuropeptide Y (another indicator of sustained sympathetic activity) are elevated in young prehypertensive SHR [41]. Another indicator of sympathetic hyperactivity in juvenile SHR is baseline tachycardia. This sympathetic hyperresponsiveness in SHR results from diminished norepinephrine reuptake and stronger intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals in sympathetic nerve terminals [26, 41]. Even so, juvenile SHR remain normotensive until about 6 weeks of age by downregulation of catecholamine biosynthesis in the adrenal medulla and sympathetic ganglia [46].

Our starting hypothesis was that in prehypertensive (4–5 weeks old) SHR, adrenal catecholamine release would be higher than age-matched WKY but less robust than in (12 weeks old) hypertensive SHR. To evaluate these ontogenetic changes, baseline and stimulated single-cell catecholamine release from prehypertensive and hypertensive SHR was examined together with stimulus-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals compared with normotensive WKY rats from the same age. Dense core granule size and density were also examined.

### Blood pressure

BP and heart rate of *preSHRs* were not statistically different from age-matched WKY rats. Conversely, in *hypSHRs*, systolic and diastolic BP were 30 and 25% higher, respectively, and the heart rate was 29% higher than in age-matched WKY rats. These data support the conclusion that the age groups chosen for this comparative study are adequate.

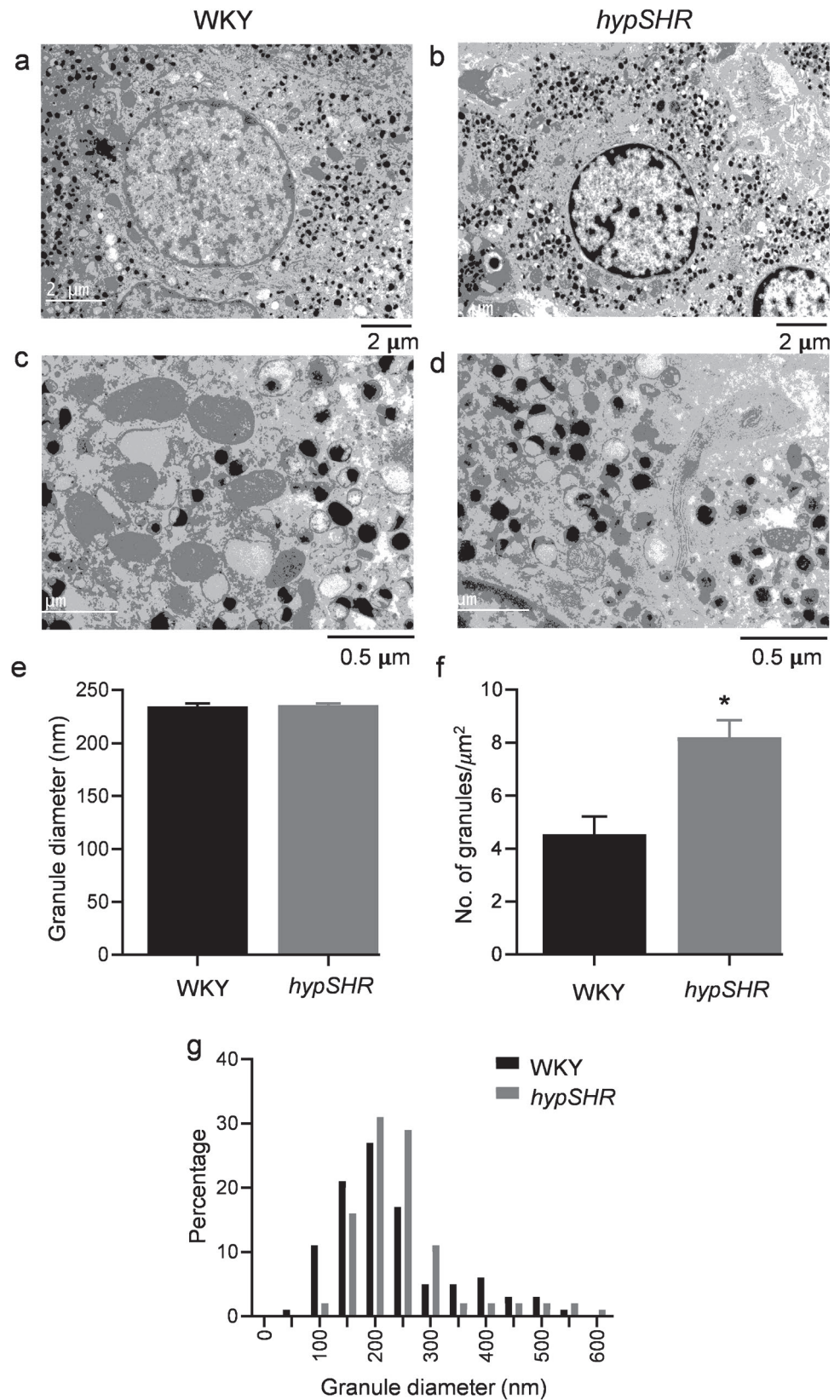
### Spontaneous catecholamine exocytosis from *preSHR* and *hypSHR* CCs

Spontaneous amperometric spikes, recorded in *preSHR* and *hypSHR*, had a similar frequency than age-matched WKY CCs (Fig. 1a, b and Fig. 1e, f). The peak cumulative charge (a measure of the rate of exocytosis) is slightly higher in both *preSHR* and *hypSHR* than in age-matched WKY CCs (Table 1). The difference in exocytosis rate is likely to become significant if longer-lasting recordings are compared. In general, the values of mean charge per spike and spike amplitude reported here agree with previous data from early hypertensive SHR CCs [30, 39].

### Depolarization-induced secretory responses in *preSHR* CCs

We and others previously reported that CCs from SHR secrete more catecholamines [29, 30, 39]. We found that in *preSHR* CCs, the secretory response elicited by a brief depolarization is more robust and longer-lasting than in WKY CCs. Accordingly, the mean peak cumulative charge (a measure of catecholamine secretion) is 2.9-fold higher in *preSHR* than in WKY CCs. When these data are subdivided into subgroups, we found that the secretion rate of *subgroup 1* (50% of the sample) is indistinguishable from WKY CCs and that *subgroups 2* and *3* display peak cumulative charges 3- and sixfold larger, respectively, than WKY CCs (Table 1). The latter CCs were named “super-secreting” and “hyper-secreting.” These findings suggest that half of SHR CCs secrete at a normal rate during the prehypertensive

**Fig. 7** Comparison of dense-core granules in WKY and *hypSHR* CCs. **a, b** Representative electron micrographs of WKY (**a**) and *hypSHR* adrenal gland (**b**). **c, d** Electron micrographs at higher magnification from WKY (**c**) and *hypSHR* adrenal gland (**d**). **e** Bar plot of the diameter of dense-core granules from WKY (black bar) and *hypSHR* (gray bar) ( $234 \pm 3$  and  $235 \pm 2$  nm, respectively,  $p=0.64$ ). **f** Bar plot of the density of granules per unit area in WKY (black bar) and *hypSHR* (gray bar) ( $4.5 \pm 0.7$  versus  $8.2 \pm 0.6$  granules/ $\mu\text{m}^2$  respectively,  $p=0.001$ ); unpaired *t*-test. **g** Frequency histogram of granule size in WKY (dark bars) and *hypSHR* (gray bars). Granule size distributions are very similar, with most granules (72.6% of *hypSHR* and 54.3% of WKY) ranging between 200 and 400 nm (*hypSHR*  $n=2170$  granules; WKY  $n=1298$ ). Our data set comprises 15 EM pictures of 12-week-old *hypSHR*, and 10 EM pictures of age-matched WKY rats ( $n=3$  rats from each strain)





stage, while the other half comprises super and hyper-secreting CCs. Spike parameter values (charge per spike, spike peak amplitude, number of spikes, and burst duration) of *subgroups 2* and *3* are significantly greater than those of *subgroup 1*. Of these parameters, the charge per spike and the burst duration had the most significant contribution (Table 1). It would be interesting to determine if such a heterogeneous population of SHR CCs persists at later stages of hypertension.

### Comparison of secretory rate between *preSHRs* and *hypSHRs*

One may wonder: which SHR CCs (prehypertensive or hypertensive) release more catecholamines in response to membrane depolarization? The answer is not straightforward. Both *preSHR* and *hypSHR* CCs display stronger exocytosis than age-matched WKY CCs. However, the increase in exocytosis found is very similar (~2.8-fold), contrary to our expectation.

Nonetheless, the absolute secretion rate of *hypSHRs* is only 1.2-fold higher than *preSHR* CCs, even though the difference spike amplitude is 1.7-fold higher. Why is the rate of secretion not higher in *hypSHR*? A likely explanation is that CCs from *hypSHRs* produce 10% fewer spikes, and their half-width duration is 30% briefer than in *preSHRs* CCs. Interestingly, the spike half-width (related to the granule's speed of exocytosis) of *hypSHR* CCs is the shortest of all CCs groups ( $t_{1/2} = 8.1$  ms; Table 1). This data is consistent with earlier reports that plasma adrenaline levels of SHRs are similar to normotensive WKY rats after 24 weeks of age [39].

### Caffeine-induced secretory responses of *preSHR* CCs

After readily crossing the plasma membrane, caffeine triggers  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores, bypassing membrane depolarization. The longer delay (about 3.2 s) before the first amperometric spike is recorded likely results from caffeine diffusion, rate of  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER, and diffusion of  $\text{Ca}^{2+}$  to the sites of exocytosis. The caffeine-induced exocytosis in *preSHR* is nearly twofold larger than in WKY CCs (Table 1). In comparison, it is 2.7-fold higher after membrane depolarization. The difference results from the generation, after caffeine stimulation, of fewer spikes with a smaller charge per spike (Table 1). In summary, catecholamine secretion in *preSHR* CCs is characterized by amperometric spikes of greater charge and peak amplitude than age-matched WKY CCs, regardless of the type of stimulus.

### Role of CICR in depolarization-induced exocytosis of *preSHR* CCs

The smooth endoplasmic reticulum (ER) operates as an intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  store.  $\text{InsP}_3$  receptors ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) and ryanodine receptors (RyRs) are intracellular channels that release  $\text{Ca}^{2+}$  to the cytosol in response to  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevations, thus providing a mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  signal amplification termed CICR [2, 19, 35]. Ryanodine, an irreversible RyRs blocker that obliterates RyR-mediated CICR [43, 48], was used to assess its contribution to the release of catecholamines. After ryanodine incubation, the cumulative charge diminished by less than 14%, in WKY CCs, with no effects on spike parameters (see Fig. 4e and Table 2). Conversely, in *preSHR* CCs, the cumulative charge fell by 57% after ryanodine treatment (see Fig. 4k). Accordingly, the charge per spike, spike amplitude, and the number of spikes generated diminished significantly (14%, 25%, and 50%, respectively; Table 2). In early hypertensive SHR CCs, ryanodine caused a more drastic reduction (77%) in cumulative charge, mainly due to a reduction of 22% in charge per spike and of 71% in the number of spikes [39]. These results demonstrate that CICR also contributes significantly to catecholamine hypersecretion in *preSHR* CCs.

### Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ signals in *preSHR*, *hypSHR*, and WKY CCs

Since the same stimulus recruits more amperometric spikes of larger size in SHR than in WKY CCs, we speculated that this is due to the generation of stronger intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals. Accordingly, in both *preSHR* and *hypSHR* CCs, depolarization, and caffeine triggered greater  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise (1.5- and 1.4-fold; and 1.7- and 1.5-fold, respectively) than in WKY CCs (Fig. 5 b, d, f, and h). In our previous report in SHR,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increases were 3.2- and 2.5-fold greater (depolarization and caffeine, respectively) than in WKY CCs [39].

The fact that both stimuli trigger slightly bigger  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  signals in *hypSHR* than in *preSHR* (see Fig. 5) agrees with amperometric data, supporting the idea that catecholamine hypersecretion is linked to stronger intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals [39]. Enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling has been reported in the soma of stellate and superior cervical ganglia neurons of prehypertensive 4-week-old SHRs and ganglionic neurons from adult SHRs [26]. Bigger  $\text{Ca}^{2+}$  signals are likely to occur in their sympathetic nerve terminals, causing a stronger  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent release of catecholamines.

### Mechanisms involved in the enhanced secretory phenotype of SHR CCs

On average, *preSHR* CCs secrete 2.9-fold more catecholamines than WKY CCs (Fig. 2c). However, in about half of



these CCs, catecholamine secretion is unaffected, while the remaining ones secrete 3- and sixfold more than WKY CCs. Likewise, CCs secrete, on average, 2.8-fold more catecholamines during the hypertensive stage than WKY CCs [see also 39]. Which mechanism is responsible for the appearance of the hypersecretory phenotype in the CCs population?

In SHR, the pre-celiac splanchnic nerve fibers display a higher baseline electrical activity, and the preganglionic sympathetic fibers innervating the adrenal gland have enhanced responses to hypothalamic stimulation [31]. Therefore, one may speculate that sustained synaptic input may dysregulate juvenile SHR CCs, leading to the hypersecretory phenotype (44). By analogy, chronic administration of the anti-hypertensive agent reserpine reflexively increases the synaptic stimulation of CCs and induces their proliferation *in vivo* [42, 45]. Since adrenal denervation prevents cell proliferation in this pheochromocytoma model, it is assumed that nerve fiber hyperactivity triggers adrenal medulla hyperplasia and neoplasia [44]. Neonatal sympathectomy causes BP in adult SHR to reach intermediate values between untreated SHR and age-matched normotensive WKY rats, suggesting that the adrenal medulla without sympathetic input still contributes to adult hypertension [25]. It is decisive to determine if the hypersecretory phenotype in the adult SHR is delayed or prevented by juvenile sympathectomy or adrenal denervation.

### Comparison of dense-core granules in *preSHR*, *hypSHR*, and WKY CCs

Since the intragranular catecholamine concentration is constant [1], the amount detected by amperometry is proportional to the granule volume [1, 49]. Assuming a proportionality of the cubic root of the charge per spike ( $Q^{1/3}$ ) X 200 with the radius of the secreted granule [14], we estimated a mean granule size of 336 nm for *preSHR* and 235 nm for WKY and 415.6 nm versus 315 nm for *hypSHR* and WKY (data for depolarization-induced exocytosis: see [39]). Nonetheless, the mean granule size obtained from TEM images does not support the hypothesis that SHR CCs contain more medium and large-sized granules in their cytoplasm (Table 4). Nonetheless, TEM images did show a significant difference in granule density per unit area in *preSHR* and *hypSHR* compared to WKY CCs. These findings suggest that catecholamine's enhanced secretion in SHR CCs could also be due to an excess of secretory granules in the cytoplasm, making exocytosis more likely. The higher density of granules in the cytoplasm of SHR CCs has been reported earlier [33].

Thus, the higher incidence of medium and large amperometric spikes in *preSHR* and *hypSHR* compared with WKY CCs cannot be explained by granule size differences

[39]. Therefore, the bias of SHR CCs towards secreting more medium and large granules is still unexplained. As discussed earlier, a depolarizing stimulus recruits fewer and smaller spikes in the same *preSHR* CCs after ryanodine treatment, suggesting that exocytosis of large secretory granules requires stronger  $Ca^{2+}$  signals. Neuroendocrine cells (including adrenal CCs) express multiple isoforms of synaptotagmin,  $Ca^{2+}$  sensors for triggering exocytosis with different  $Ca^{2+}$  sensitivities [5, 9]. Thus, syt VII has a high  $Ca^{2+}$  sensitivity, syt IX an intermediate  $Ca^{2+}$  sensitivity, and syt I a low  $Ca^{2+}$  sensitivity. These isoforms distribute to dense-core vesicles (DCV) of different sizes [50]. Thus, the release of more medium and large granules in SHR CC could be related to differential expression of synaptotagmin isoforms with different  $Ca^{2+}$  sensitivities [16, 17].

Our study in the SHRs model demonstrates that catecholamine hypersecretion and enhanced intracellular  $Ca^{2+}$  signals in adrenal CCs can develop *before the onset of hypertension*. Functionally, this translates into a more robust stimulus-induced  $Ca^{2+}$  signaling and catecholamine secretion, which could explain, in part, the increased plasma catecholamine levels and tachycardia reported in SHRs before hypertension develops. Accordingly, nearly half of the CC population display super- and hyper-secretion of catecholamine, although the other half have not transitioned yet to the enhanced secretory phenotype. The mechanism responsible for this heterogeneous secretory phenotype in the population of SHR CCs remains unexplained.

**Acknowledgements** The authors wish to thank Drs. Citlali Trueta and Fredy Cifuentes for discussions and advice, MVZ Claudia V. Riveracerecedo for expert animal breeding, and Francisco Perez for expert computing assistance. Peña del Castillo J. G. is a Ph. D. student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship #306030 from CONACyT. This study was conducted as part of the requirements to obtain her Ph. D. Supported by Grants 315803 and 314839 to A-HC from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México and PAPIIT AG200119 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM). Also supported by a grant from Ministerio de Ciencia e Innovación (Project PID2020-114824GB-I00 to LMG).

**Author contribution** Peña-del Castillo performed the experiments, analyzed data, prepared figures, and wrote the paper, Segura Chama performed research and analyzed data, Rincón-Heredia analyzed data, Diana Millán-Aldaco performed research, contributed new methods, Yolanda Giménez-Molina, José Villanueva, and Luis Miguel Gutiérrez, contributed new method and analyzed data. Arturo Hernández-Cruz conceived the study, wrote the paper.

**Funding** This study is financially supported by Grants 315803 (Laboratorio Nacional de Canalopatías) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, and PAPIIT AG200119 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico

(DGAPA-UNAM) and by a grant of Ministerio de Ciencia e Innovación (Project PID2020-114824GB-I00 to LMG).

**Data availability** The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Ethics approval** Research involving animals complies with the Mexican Guide's guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of the Secretary of Agriculture (SAGARPA NOM-062-Z00-1999). The Institutional Committee of Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL-IFC) approved the experimental protocols used here (protocol AHC24-141). Research does not involve human patients.

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

## References

- Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, de Toledo GA, Lindau M (1997) The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 389(6650):509–512. <https://doi.org/10.1038/39081>
- Alonso MT, Barrero MJ, Michelena P, Carnicero E, Cuchillo I, García AG, García-Sancho J, Montero M, Alvarez J (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in chromaffin cells seen from inside the ER with targeted aequorin. *J Cell Biol* 144(2):241–254. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.241>
- Anderson EA, Sinkey CA, Lawton WJ, Mark AL (1989) Elevated sympathetic nerve activity in borderline hypertensive humans. Evidence from direct intraneural recordings. *Hypertension* 14(2):177–183. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.14.2.177>
- Aoki K, Takikawa K, Hotta K (1973) Role of adrenal cortex and medulla in hypertension. *Nat New Biol* 241(108):122–123. <https://doi.org/10.1038/newbio241122a0>
- Bhalla A, Chicka MC, Chapman ER (2008) Analysis of the synaptotagmin family during reconstituted membrane fusion. *J Biol Chem* 283(31):21799–21807. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709628200>
- Borkowski KR, Quinn P (1983) The effect of bilateral adrenal demedullation on vascular reactivity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 80(3):429–437. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1983.tb10712.x>
- Carbone E, Borges R, Eiden LE, García AG, Hernández-Cruz A (2019) Chromaffin cells of the adrenal medulla: physiology, pharmacology, and disease. *Compr Physiol* 9(4):1443–1502. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190003>
- de Champlain J, Farley L, Cousineau D, van Ameringen MR (1976) Circulating catecholamine levels in human and experimental hypertension. *Circ Res* 38(2):109–114. <https://doi.org/10.1161/01.RES.38.2.109>
- Chapman ER (2008) How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Ann Rev Biochem* 77(1):615–641. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062005.101135>
- Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL (1995) Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*. 91(1):161–170. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.1.161>
- Currie G, Freel EM, Perry CG, Dominiczak AF (2012) Disorders of blood pressure regulation—role of catecholamine biosynthesis, release, and metabolism. *Curr Hypertens Rep* 14(1):38–45. <https://doi.org/10.1007/s11906-011-0239-2>
- Esler M (2000) The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens* 13(6):S99–S105. [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(00\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(00)00225-9)
- Esler M, Rumanitir M, Kaye D, Jennings G, Hastings J, Socratous F, Lambert G (2001) Sympathetic nerve biology In Essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(12):986–989. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2001.03566.x>
- Finnegan JM, Pihel K, Cahill PS, Huang L, Zerby SE, Ewing AG, Kennedy RT, Wightman RM (1996) Vesicular quantal size measured by amperometry at chromaffin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic beta-cells. *J Neurochem* 66(5):1914–1923. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.66051914.x>
- Flaa A, Mundal HH, Eide I, Kjeldsen S, Rostrop M (2006) Sympathetic activity and cardiovascular risk factors in young men in the low, normal, and high blood pressure ranges. *Hypertension*. 47(3):396–402. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000203952.27988.79>
- Fukuda M, Kanno E, Satoh M, Saegusa C, Yamamoto A (2004) Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* 279(50):52677–52684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409241200>
- Fukuda M, Kowalchuk JA, Zhang X, Martin TFJ, Mikoshiba K (2002) Synaptotagmin IX Regulates Ca<sup>2+</sup>-dependent Secretion in PC12 Cells. *J Biol Chem* 277(7):4601–4604. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100588200>
- Hernández-Cruz A, Díaz-Muñoz M, Gómez-Chavarrín M, Cañedo-Merino R, Protti DA, Escobar AL, Sierralta J, Suárez-Isla BA (1995) Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 7(8):1684–1699. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00690.x>
- Hernández-Cruz A, Escobar AL, Jiménez N (1997) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release phenomena in mammalian sympathetic neurons are critically dependent on the Rate of rise of trigger Ca<sup>2+</sup>. *J Gen Physiol* 109(2):147–167. <https://doi.org/10.1085/jgp.109.2.147>
- Jablonskis LT, Howe PRC (1994) Elevated plasma adrenaline in spontaneously hypertensive rats. *Blood Pressure* 3(1–2):106–111. <https://doi.org/10.3109/08037059409101529>
- Judy WV, Farrell SK (1979) Arterial baroreceptor reflex control of sympathetic nerve activity in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1(6):605–614
- Kiprov D (1980) Experimental models of hypertension. *Cor Et Vasa*. 22(1–2):116–128
- Kuba K (1994) Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> Release in Neurons. *Jpn J Physiol* 44(6):613–650. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.44.613>
- Lee RM, Borkowski KR, Leenen FH, Tsoporis J, Coughlin M (1991) Combined effect of neonatal sympathectomy and adrenal demedullation on blood pressure and vascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 69(3):714–721. <https://doi.org/10.1161/01.RES.69.3.714>
- Lee RM, Triggler CR, Cheung DW, Coughlin MD (1987) Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* (Dallas, Tex.: 1979) 10(3):328–338. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.10.3.328>
- Li D, Lee C, Buckler K, Parekh A, Herring N, Paterson DJ (2012) Abnormal intracellular calcium homeostasis in sympathetic neurons from young prehypertensive rats. *Hypertension* 59(3):642–649. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186460>
- Lundin SA, Hallback-Nordlander M (1980) Background of hyperkinetic circulatory state in young spontaneously hypertensive rats.

- Cardiovasc Res 14(10):561–567. <https://doi.org/10.1093/cvr/14.10.561>
28. Malgaroli A, Fesce R, Meldolesi J (1990) Spontaneous  $[Ca^{2+}]_i$  fluctuations in rat chromaffin cells do not require inositol 1,4,5-trisphosphate elevations but are generated by a caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular  $Ca^{2+}$  store. *J Biol Chem* 265(6):3005–3008
  29. Miranda-Ferreira R, de Pascual R, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A, García AG (2009) Role of the endoplasmic reticulum and mitochondria on quantal catecholamine release from chromaffin cells of control and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 329(1):231–240. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.147413>
  30. Miranda-Ferreira R, de Pascual R, de Diego AMG, Caricati-Neto A, Gandía L, Jurkiewicz A, García AG (2008) Single-vesicle catecholamine release has greater quantal content and faster kinetics in chromaffin cells from hypertensive, as compared with normotensive, rats. *J Pharmacol Exp Ther* 324(2):685–693. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.128819>
  31. Morrison SF, Whitehorn D (1984) Enhanced preganglionic sympathetic nerve responses in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 296(1):152–155. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90522-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90522-5)
  32. Mosharov EV, Sulzer D (2005) Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods*. 2(9):651–658. <https://doi.org/10.1038/nmeth782>
  33. Musial DC, Bomfim GH, Arranz-Tagarro JA, Méndez-López I, Miranda-Ferreira R, Jurkiewicz A, Jurkiewicz NH, García AG, Padín JF (2017) Altered mitochondrial function, calcium signaling, and catecholamine release in chromaffin cells of diabetic and SHR rats. *Eur J Pharmacol* 815:416–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.045>
  34. Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jpn Circ J* 27(3):282–293. <https://doi.org/10.1253/jcj.27.282>
  35. Padín JF, de Diego AMG, Fernández-Morales JC, Merino C, Maroto M, Calvo-Gallardo E, Arranz JA, Yáñez M, García AG (2012) Resveratrol augments nitric oxide generation and causes store calcium release in chromaffin cells. *Eur J Pharmacol* 685(1–3):99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.040>
  36. Pak CH (1981) Plasma adrenaline and noradrenaline concentrations of the spontaneously hypertensive rat. *Jpn Heart J* 22(6):987–995. <https://doi.org/10.1536/ihj.22.987>
  37. Pinto Y (1998) Lessons from rat models of hypertension from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 39(1):77–88. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(98\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(98)00077-7)
  38. Sakaguchi A, LeDoux JE, Reis DJ (1983) Sympathetic nerves and adrenal medulla: contributions to cardiovascular-conditioned emotional responses in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 5(5):728–738. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.5.5.728>
  39. Segura-Chama P, López-Bistrain P, Pérez-Armendáriz EM, Jiménez-Pérez N, Millán-Aldaco D, Hernández-Cruz A (2015) Enhanced  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores contributes to catecholamine hypersecretion in adrenal chromaffin cells from spontaneously hypertensive rats. *Pflügers Archiv - Eur J Physiol* 467(11):2307–2323. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1702-8>
  40. Shamanaev AY, Aliev OI, Anishchenko AM, Sidekhmenova AV, Plotnikov MB (2016) Specificity of the Hemodynamic Indices' Shift in SHR Line Rats at Different Age. *Ontogenez* 47(5):320–323
  41. Shanks J, Manou-Stathopoulou S, Lu C-J, Li D, Paterson DJ, Herring N (2013) Cardiac sympathetic dysfunction in the prehypertensive spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 305(7):H980–H986. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00255.2013>
  42. Sietzen M, Schober M, Fischer-Colbrie R, Scherman D, Sperk G, Winkler H (1987) Rat adrenal medulla: Levels of chromogranins, enkephalins, dopamine  $\beta$ -hydroxylase and of the amine transporter are changed by nervous activity and hypophysectomy. *Neuroscience* 22(1):131–139. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90203-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90203-X)
  43. Sutko JI, Airey JA, Welch W, Ruest L (1997) The pharmacology of ryanodine and related compounds. *Am Soc Pharmacol Exp Ther* 49:1
  44. Tischler AS, Ruzicka LA, DeLellis RA (1991) Regulation of neurotensin content in adrenal medullary cells: comparison of PC12 cells to normal rat chromaffin cells in vitro. *Neuroscience* 43(2–3):671–678. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90325-I](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90325-I)
  45. Tischler AS, Ziar J, Downing JC, McClain RM (1995) Sustained stimulation of rat adrenal chromaffin cell proliferation by reserpine. *Toxicol Appl Pharmacol* 135(2):254–257. <https://doi.org/10.1006/taap.1995.1231>
  46. Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, Vaněčková I, Zicha J (2019) Which sympathoadrenal abnormalities of adult spontaneously hypertensive rats can be traced to a prehypertensive stage? *Hypertens Res* 42(7):949–959. <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0198-y>
  47. Vavřínová A, Behuliak M, Bencze M, Vodička M, Ergang P, Vaněčková I, Zicha J (2019) Sympathectomy-induced blood pressure reduction in adult normotensive and hypertensive rats is counteracted by enhanced cardiovascular sensitivity to vasoconstrictors. *Hypertens Res* 42(12):1872–1882. <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0319-2>
  48. Vites AM, Pappano J (1994) Distinct modes of inhibition by ruthenium red and ryanodine of calcium-induced calcium release in avian atrium. *J Pharmacol Exp Ther* 268(3):1476–1484
  49. Wightman RM, Jankowski JA, Kennedy RT, Kawagoe KT, Schroeder TJ, Leszczyszyn DJ, Near JA, Diliberto EJ, Viveros OH (1991) Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci* 88:10754–10758
  50. Zhang Z, Wu Y, Wang Z, Dunning FM, Rehfuß J, Ramanan D, Chapman ER, Jackson MB (2011) Release mode of large and small dense-core vesicles specified by different synaptotagmin isoforms in PC12 cells. *Mol Biol Cell* 22(13):2324–2336. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-02-0159>