

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Vías de señalización de peróxido de hidrógeno en las arterias  
coronarias: papel del calcio y alteraciones en la obesidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Elvira Santiago Prieto**

Directores

Dolores Prieto Ocejo  
Albino García Sacristán  
Belén Climent Flórez

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA  
Departamento de Fisiología



**TESIS DOCTORAL**

**Vías de señalización del peróxido de hidrógeno en las arterias  
coronarias: papel del calcio y alteraciones en la obesidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Elvira Santiago Prieto**

Madrid, 2015





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE FISIOLÓGÍA ANIMAL

Dolores Prieto Ocejo, Catedrática de Fisiología, Albino García Sacristán, Catedrático de Fisiología, y Belén Climent Flórez, Profesora Ayudante Doctor de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

#### CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup> **Elvira Santiago Prieto**, Licenciada en Farmacia y Máster en Ciencias Farmacéuticas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección, el trabajo de investigación titulado **“Vías de señalización del peróxido de hidrógeno en las arterias coronarias: papel del calcio y alteraciones en la obesidad”** para optar al Grado de Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Mayo de 2015

Prof. Dra. Prieto Ocejo

Dra. Climent Flórez

Prof. Dr. García Sacristán



***A mi familia y a David***



## **Agradecimientos**

*Durante los años que ha durado la realización de esta Tesis Doctoral, son muchos los que me han prestado su apoyo, su ayuda y sus consejos. En este apartado intentaré resumir la gratitud que siento hacia todas estas personas que han estado presentes en esta etapa y sin las cuales hubiera sido imposible realizar este proyecto.*

*En primer lugar agradecer a mi directora de tesis, la Prof. Dolores Prieto, todas las horas que me ha dedicado, en las que me ha enseñado con paciencia y me ha transmitido su pasión por la investigación. Sin su dedicación este trabajo no hubiera sido posible.*

*A la Dra. Belén Climent, co-directora de esta tesis, por todas las horas empleadas en este trabajo, todo el tiempo que me ha dedicado, por su costancia y sus valiosos consejos, y sobre todo, por el apoyo que me ha dado y que ha hecho que la realización de este trabajo sea mucho más fácil.*

*Al Prof. Albino García-Sacristán, co-director de este trabajo, por abrirme las puertas del Departamento de Fisiología. Gracias por las enseñanzas, los consejos, y el apoyo que me ha brindado.*

*Al Prof. Luis Rivera, por animarme a formar parte de este proyecto y por ayudarme a dar los primeros pasos en el laboratorio, sin los cuales no habría descubierto el mundo de la investigación y nunca habría empezado este trabajo.*

*A todos los profesores del Departamento por la ayuda prestada, por lo que me habéis enseñado durante la carrera y durante el tiempo que he estado trabajando en esta tesis.*

*A la Dra. María Pilar Martínez del Departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria de la UCM por el gran trabajo realizado con la inmunohistoquímica.*

*Gracias a la Dra. Cristina Contreras por ayudarme, enseñarme y aconsejarme en el comienzo de este largo camino. Y a todos los compañeros del Departamento de Fisiología por su compañía durante las largas horas en el laboratorio y por ayudarme en todo lo que han podido: los Dres. Ana Sánchez, Ana Sofía Fernandes, Vitor Leire y los doctorandos Mercedes e Igor. ¡Mucha suerte en vuestras tesis!*

*A Francisco Puentes, Manuel Perales y Macarena Martín, por su inestimable ayuda técnica y administrativa, por ayudar tanto con el trabajo en el laboratorio, y por aportar esa alegría que tanto se contagia.*

*A todos mis compañeros del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Puerta de Hierro, con quienes he compartido –y sigo compartiendo– tantos valiosos momentos profesionales y personales. Gracias a todos por vuestro ánimo y por hacer el trabajo mucho más fácil.*

*A mis padres, por vuestro ejemplo, por lo que me habéis enseñado, por apoyarme en todos los momentos importantes, y sobre todo por ayudarme a conseguir todas mis metas. Sin vosotros no hubiera podido llegar hasta aquí. A mis hermanos, por ayudarme siempre que lo necesito y por vuestro cariño. Os quiero.*

*Y por último, a David. Gracias por creer en mí, por tu apoyo, tu paciencia, por estar ahí en los buenos y los malos momentos, y por ayudarme siempre que has podido. Y por supuesto, por tu ayuda técnica. ¡TLLM!*

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (2012-31631) y por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-10448).



## ABREVIATURAS

|                            |   |
|----------------------------|---|
| 2-APB                      | 2-aminoetoxidifenil borato                                    |
| 5-HT                       | 5-hidroxi-triptamina  |
| ACD                        | Arteria coronaria distal                                      |
| ACP                        | Arteria coronaria proximal                                    |
| AM                         | Arteria mesentérica   |
| Ang II                     | Angiotensina II   |
| ARC                        | Canal selectivo de $Ca^{2+}$ regulado por ácido araquidónico  |
| BH <sub>4</sub>            | 5, 6, 7, 8-tetrahidrobiopterina                               |
| BK <sub>Ca</sub>           | Canales de $K^+$ activados por $Ca^{2+}$ de gran conductancia |
| [ $Ca^{2+}$ ] <sub>i</sub> | Concentración intracelular de $Ca^{2+}$                       |
| CaM                        | Calmodulina   |
| CaMKII                     | Proteína quinasa $Ca^{2+}$ calmodulina dependiente II         |
| CCR                        | Curva concentración respuesta                                 |
| COX                        | Ciclooxigenasa  |
| CPA                        | Ácido ciclopiazónico  |
| CRAC                       | Canales de $Ca^{2+}$ activados por la liberación de $Ca^{2+}$ |
| DAPI                       | 4',6-diamino-2-fenilindol                                     |
| DAG                        | Diacilglicerol  |
| DTT                        | Dithiothreitol  |
| EDCF                       | Factor contráctil derivado del endotelio                      |
| EDH                        | Respuesta hiperpolarizante derivada del endotelio             |
| EDHF                       | Factor hiperpolarizante derivado del endotelio                |
| EDRF                       | Factor relajante derivado del endotelio                       |
| EGF                        | Factor de crecimiento epidérmico                              |
| eNOS                       | Óxido nítrico sintasa endotelial                              |
| ERK                        | Quinasa regulada por señales extracelulares                   |
| ET-1                       | Endotelina-1  |
| FAD                        | Flavín adenin dinucleótido                                    |
| GC                         | Guanilato ciclasa   |
| GPx                        | Glutation peroxidasa  |
| GSH                        | Glutation   |
| GSSH                       | Glutation disulfuro oxidado                                   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrógeno   |
| HO·                           | Radical hidroxilo   |
| IK <sub>Ca</sub>              | Canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup> de intermedia conductancia |
| I <sub>CRAC</sub>             | Corriente de Ca <sup>2+</sup> activada por la liberación de Ca <sup>2+</sup>        |
| IL                            | Interleuquina   |
| iNOS                          | Óxido nítrico sintasa inducible   |
| IP                            | Receptor de prostaciclina   |
| IP3                           | Inositoltrifosfato  |
| IP3R                          | Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato   |
| JNK                           | QuinasadelextremoN-terminal de c-Jun  |
| K <sup>+</sup> 30             | Solución salina fisiológica de potasio 30 mM  |
| K <sub>ATP</sub>              | Canales de K <sup>+</sup> sensibles a ATP   |
| K <sub>Ca</sub>               | Canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup>                            |
| KPSS                          | Solución salina fisiológica rica en potasio   |
| K <sub>v</sub>                | Canales de K <sup>+</sup> voltaje dependientes                                      |
| LOX                           | Lipooxigenasas  |
| MAPK                          | Protein quinasas activadas por mitógenos  |
| MLC                           | Cadenas ligeras de miosina  |
| MLCK                          | Quinasa de cadenas ligeras de miosina   |
| MLV                           | Músculo liso vascular   |
| MMP                           | Metaloproteinasas   |
| MPO                           | Mieloperoxidasa   |
| NADPH                         | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato   |
| NCX                           | Intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>                                    |
| NF-κB                         | Factor nuclear Kappa B  |
| nNOS                          | Óxido nítricosintasa neuronal   |
| NO                            | Óxido nítrico   |
| NOS                           | Óxido nítricosintasa  |
| O <sub>2</sub>                | Oxígeno   |
| ·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | Radical (anión) superóxido  |
| ONOO <sup>-</sup>             | Anión peroxinitrito   |
| PCR                           | Proteína C reactiva   |
| PDGF                          | Factor de crecimiento derivado de plaquetas   |
| PG                            | Prostaglandina  |

|                  |  |
|------------------|--|
| Phe              | Fenilefrina  |
| PI3K/Akt         | Fosfoinositol-3-quinasa/Aktquinasa   |
| PIP2             | Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato  |
| PK               | Protein quinasa  |
| PLC              | Fosfolipasa C  |
| PMCA             | Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de la membrana plasmática                               |
| PSS              | Solución salina fisiológica  |
| PTK              | Protein tirosin quinasa  |
| PTP              | Protein tirosin fosfatasas   |
| RE               | Retículo endoplásmico  |
| RNS              | Especies reactivas de nitrógeno  |
| ROC              | Canales de Ca <sup>2+</sup> operados por receptor                                |
| ROS              | Especies reactivas de oxígeno  |
| RS               | Retículo sarcoplásmico   |
| RZL              | Rata zucker lean   |
| RZO              | Rata zucker obesa  |
| RyR              | Receptor de rianodina  |
| SERCA            | Ca <sup>2+</sup> -ATPasa del retículo endoplásmico- sarcoplásmico                |
| SK <sub>Ca</sub> | Canales de K <sup>+</sup> activados por Ca <sup>2+</sup> de pequeña conductancia |
| SM               | Síndrome Metabólico  |
| SOC              | Canales de Ca <sup>2+</sup> operados por depósitos                               |
| SOD              | Superóxido dismutasa   |
| STIM             | Molécula de interacción estromal   |
| TNF- $\alpha$    | Factor de necrosis tumoral- $\alpha$   |
| TP               | Receptor del tromboxano  |
| TRP              | Receptores de potencial transitorio  |
| TRPC             | Receptores de potencial transitorio catiónicos                                   |
| Trx              | Tiorredoxina   |
| TX               | Tromboxano   |
| VEGF             | Factor de crecimiento del endotelio vascular                                     |
| VOC              | Canales de Ca <sup>2+</sup> operados por voltaje                                 |
| XO               | Xantina oxidasa  |
| XOR              | Xantina oxidorreductasa  |



# ÍNDICE



|  |            |
|--|------------|
| <b>I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>1</b>   |
| <b>1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y FUNCIÓN VASCULAR</b> .....                             | <b>3</b>   |
| 1.1. Especies reactivas de oxígeno .....   | 3          |
| 1.2. Producción y metabolismo de ROS .....   | 5          |
| 1.3. Dianas moleculares de las especies reactivas de O <sub>2</sub> .....                    | 15         |
| 1.4. Procesos fisiológicos regulados por las ROS .....                                       | 20         |
| 1.5. ROS y función vascular .....  | 22         |
| 1.6. Estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular .....                                      | 41         |
| <b>2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y CALCIO</b> .....                                       | <b>58</b>  |
| 2.1. Homeostasis del Ca <sup>2+</sup> intracelular .....                                     | 58         |
| 2.2. Señalización de Ca <sup>2+</sup> en la pared vascular.....                              | 61         |
| 2.3. Entrada de Ca <sup>2+</sup> operada por depósito .....                                  | 69         |
| 2.4. Señalización de Ca <sup>2+</sup> a través de especies reactivas de O <sub>2</sub> ..... | 75         |
| <b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....   | <b>87</b>  |
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....   | <b>92</b>  |
| <b>1. MATERIAL</b> .....   | <b>95</b>  |
| 1.1. Material biológico .....  | 95         |
| 1.2. Material de laboratorio .....   | 96         |
| 1.3. Reactivos .....   | 97         |
| 1.4. Soluciones.....   | 99         |
| <b>2. MÉTODOS</b> .....  | <b>102</b> |
| 2.1. Estudios funcionales.....   | 102        |
| 2.2. Determinación del Ca <sup>2+</sup> intracelular por ratio-fluorimetría .....            | 104        |
| 2.3. Protocolos experimentales para los estudios funcionales.....                            | 107        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 2.4.       | Medida de la producción de aniones superóxido por quimioluminiscencia .....  | 112        |
| 2.5.       | Inmunohistoquímica .....   | 113        |
| 2.6.       | Cálculos y análisis de los resultados.....   | 114        |
| <b>IV.</b> | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>115</b> |
| <b>1.</b>  | <b>EFFECTOS VASOACTIVOS DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN ARTERIAS CORONARIAS.....</b>   | <b>119</b> |
| 1.1.       | Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre arterias coronarias y mesentéricas precontraídas con el agonista del tromboxano A <sub>2</sub> U46619 y con K <sup>+</sup> 30 ..... | 119        |
| 1.2.       | Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la tensión basal de las arterias coronarias.....  | 121        |
| <b>2.</b>  | <b>MECANISMOS DE ACCIÓN DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN ARTERIAS CORONARIAS .....</b>  | <b>122</b> |
| 2.1.       | Efecto de la enzima catalasa en la contracción inducida por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en arterias coronarias.....   | 122        |
| 2.2.       | La contracción inducida por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> es dependiente del endotelio .....  | 122        |
| 2.3.       | Papel de la COX y del receptor TP en la contracción inducida por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....  | 123        |
| 2.4.       | La vasoconstricción inducida por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> está mediada a través de la formación de radicales superóxido .....  | 125        |
| 2.5.       | La activación de las MAPK y de la Rho quinasa están implicadas en la respuesta contráctil al H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....   | 127        |
| <b>3.</b>  | <b>SEÑALIZACIÓN DEL Ca<sup>2+</sup> EN LOS EFECTOS VASOACTIVOS DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN ARTERIAS CORONARIAS.....</b>  | <b>129</b> |
| 3.1.       | La vasoconstricción inducida por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> está acoplada a la entrada de Ca <sup>2+</sup> a través de canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L y no tipo L.....   | 129        |
| 3.2.       | Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la entrada capacitativa de Ca <sup>2+</sup> en arterias coronarias.....  | 135        |
| 3.3.       | Caracterización de los canales SOC activados por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....   | 140        |
| <b>4.</b>  | <b>EFFECTOS VASOACTIVOS DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN ARTERIAS CORONARIAS EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO .....</b>  | <b>148</b> |
| 4.1.       | Determinación de la producción de ROS en arterias coronarias y miocardio en condiciones de Síndrome Metabólico.....  | 148        |

|              |   |             |
|--------------|---|-------------|
| 4.2.         | Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en arterias coronarias precontraídas con agonistas y en arterias coronarias y mesentéricas precontraídas con K <sup>+</sup> 30 .....                     | 148         |
| 4.3.         | Mecanismos vasoactivos del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y vías de señalización de Ca <sup>2+</sup> en arterias coronarias bajo condiciones de Síndrome Metabólico .....                          | 151         |
| 4.4.         | Papel de la COX-2 y de los radicales ·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en los efectos vasoactivos del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en arterias coronarias en condiciones de Síndrome Metabólico ..... | 155         |
| 4.5.         | Caracterización de la entrada de Ca <sup>2+</sup> SOC inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en condiciones de Síndrome Metabólico .....  | 162         |
| <b>V.</b>    | <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>165</b>  |
| 1.           | EFFECTOS VASOACTIVOS DEL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN LAS ARTERIAS CORONARIAS .....   | 168         |
| 2.           | PAPEL DEL Ca <sup>2+</sup> EN LOS EFECTOS VASOACTIVOS DEL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN LAS ARTERIAS CORONARIAS.....   | 174         |
| 3.           | EFFECTOS VASOACTIVOS DEL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> EN LAS ARTERIAS CORONARIAS DURANTE EL SÍNDROME METABÓLICO .....  | 182         |
| <b>VI.</b>   | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>191</b>  |
| <b>VII.</b>  | <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>195</b>  |
| <b>VIII.</b> | <b>SUMMARY AND CONCLUSIONS</b> .....  | <b>2335</b> |



## **I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y FUNCIÓN VASCULAR

### 1.1. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son especies intermediarias altamente reactivas en las reacciones de oxidación-reducción del oxígeno ( $O_2$ ), produciéndose a través de la reducción gradual del  $O_2$  molecular. Estas moléculas están normalmente presentes en bajas concentraciones en el interior de las células, donde llevan a cabo un importante papel como moléculas de señalización (Szasz et al., 2007).

Dentro de este grupo de moléculas se incluyen:

- Radicales libres inestables (especies químicas con electrones desapareados en su capa más externa): radical superóxido ( $\cdot O_2^-$ ), radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), óxido nítrico (NO). Presentan una vida media relativamente corta, y por ello ejercen su efecto en un lugar cercano al que son producidos.
- Derivados de  $O_2$  no radicalarios (moléculas menos reactivas, pero más estables y de mayor vida media): peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

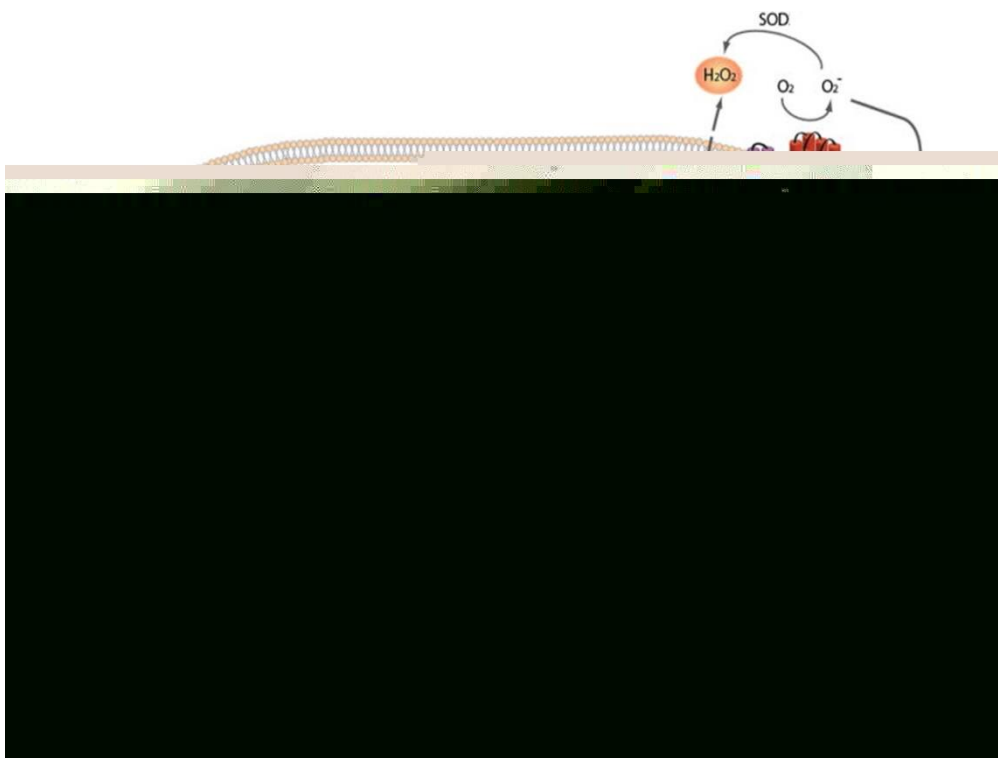
Estas distintas propiedades químicas tienen importantes implicaciones en su papel en la señalización celular. La carga que presenta el  $\cdot O_2^-$  hace que sea incapaz de atravesar las membranas celulares, excepto a través de canales iónicos. En contraste, el  $H_2O_2$  presenta una vida media mucho más prolongada y es capaz de atravesar bicapas lipídicas (Szasz et al., 2007). Estas diferencias hacen que las distintas ROS sean capaces de activar diferentes vías de señalización dentro de las células, que pueden conducir a efectos diferentes y en muchos casos contrapuestos (Paravicini y Touyz, 2006; Montezano y Touyz, 2012).

El  $\cdot O_2^-$ , formado a través de procesos metabólicos o tras la "activación" del  $O_2$  por irradiación física, es considerado la ROS "primaria", siendo la principal ROS producida *in vivo*. Presenta propiedades oxidantes y reductoras y reacciona principalmente con iones metálicos; puede interactuar con otras moléculas para generar ROS "secundarias" (Valko et al., 2007; Madamanchi y Runge, 2013). La transferencia de un electrón al  $O_2$  molecular genera  $\cdot O_2^-$ ; y la transferencia de un segundo electrón, ya sea de forma espontánea o mediado por la superóxido dismutasa (SOD), genera  $H_2O_2$ . La transferencia de un tercer electrón desde el hierro en su

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) genera  $\text{HO}\cdot$  a través de la reacción de Fenton. El  $\cdot\text{O}_2^-$  es capaz de reaccionar con el NO a un ritmo mucho más rápido que con la SOD, generando  $\text{ONOO}^-$ , un potente radical oxidante en células vasculares (Shao et al., 2012; Madamanchi y Runge, 2013).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un oxidante débil, que reacciona principalmente con tioles. La reacción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el NO produce  $\text{ONOO}^-$ . Si el  $\text{H}_2\text{O}_2$  reacciona con metales de transición rinde radicales  $\text{HO}\cdot$ , la especie más reactiva *in vivo*. El  $\text{HO}\cdot$  reacciona rápida e indiscriminadamente con biomoléculas de todos los tipos, incluidos ácidos nucleicos, nucleótidos libres, proteínas, lípidos y carbohidratos. Las ROS infringen daño oxidativo que pueden producir mutaciones en el ADN, inactivación de proteínas y muerte celular (Bartosz, 2009).



**Figura I. Principales fuentes de ROS y sistemas antioxidantes en el interior de las células.** La figura representa las principales reacciones químicas implicadas en la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  y  $\text{HO}\cdot$ , los principales lugares de producción de ROS y sistemas antioxidantes. Adaptado de: Shao et al., 2012.

Los peroxisomas son el principal lugar de consumo de  $\text{O}_2$  dentro de la célula, produciendo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero no  $\cdot\text{O}_2^-$ , que luego se utiliza para oxidar diversas moléculas. Esta organela también contiene catalasa, que descompone el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y evita la acumulación de este compuesto tóxico. Cuando los peroxisomas están dañados y las enzimas que consumen  $\text{H}_2\text{O}_2$  están reguladas a la baja, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se libera en el citosol, contribuyendo de manera significativa al estrés oxidativo (Valko et al., 2007).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Dentro del sistema cardiovascular, los principales efectos de las ROS incluyen regulación del crecimiento y diferenciación celular, modulación de la producción y rotura de la matriz extracelular, inactivación del NO, estimulación de diversas quinasas, inducción de genes de defensa del huésped, activación de factores de transcripción, y estimulación de canales iónicos de transporte (Griendling et al., 2000; Paravicini y Touyz, 2006).

El término “estrés oxidativo” describe condiciones que implican niveles crónicos elevados de ROS, y está asociado a procesos patológicos como enfermedad cardiovascular, cáncer, y envejecimiento (Paravicini y Touyz, 2006). En condiciones patológicas, las ROS están implicadas en inflamación, hipertrofia, disfunción endotelial, proliferación, migración y activación celular, deposición de la matriz extracelular, fibrosis, angiogénesis, y remodelado cardiovascular, siendo factores importantes en el desarrollo de disfunción endotelial y remodelado vascular en enfermedades cardiovasculares como hipertensión, aterosclerosis, diabetes o fallo cardíaco. Estos efectos están mediados a través de la regulación redox de múltiples moléculas señalizadoras y segundos mensajeros, entre los que se encuentran protein quinasas activadas por mitógenos (MAPK), protein tirosin fosfatasas (PTP), protein tirosin quinasas (PTK), genes proinflamatorios, canales iónicos, y  $\text{Ca}^{2+}$  (Paravicini y Touyz, 2008; Montezano y Touyz, 2012).

### 1.2. Producción y metabolismo de ROS

#### 1.2.1. Mecanismos de generación de ROS

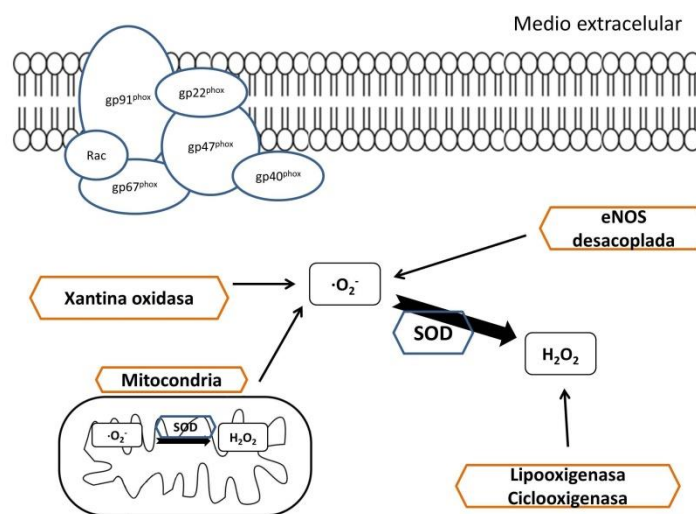
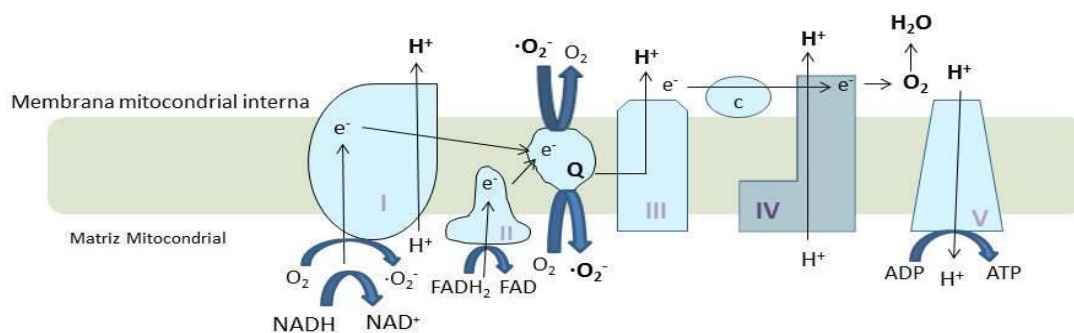


Figura II. Principales fuentes de producción de ROS en las células.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Entre los mecanismos celulares de generación de ROS caben destacar la mitocondria, las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasas, la xantina oxidasa (XO), la óxido nítrico sintasa (NOS), lipooxigenas (LOX) y ciclooxigenasas (COX).

La **cadena respiratoria mitocondrial** es la principal fuente de energía de la célula, y la principal fuente de ROS en condiciones fisiológicas. Situada en la membrana mitocondrial interna, cataliza la transferencia de electrones utilizando más de 80 péptidos organizados en cuatro complejos. Los electrones del NADH y del flavín adenin dinucleótido ( $\text{FADH}_2$ ) generados en el ciclo de Krebs son transferidos a los largo de los complejos I al IV de la cadena de transporte de electrones para reducir el  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , un proceso que implica cuatro reacciones de reducción de un electrón, produciendo un gradiente de protones. La transferencia de electrones, llevada a cabo por la coenzima Q y el citocromo C, junto con este gradiente, generalmente conduce a la formación de ATP por el quinto complejo (Madamanchi y Runge, 2013; Nickel et al., 2014).



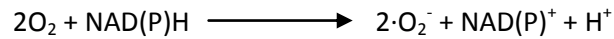
**Figura III. Regulación de la producción mitocondrial de ATP y de ROS.** El NADH y el  $\text{FADH}_2$  alimentan de electrones la cadena de transporte mitocondrial a los complejos I y II, donde dos reacciones redox secuenciales permiten la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna y el flujo de electrones a través de los complejos III y IV, donde el  $\text{O}_2$  es transformado en  $\text{H}_2\text{O}$ . Los lugares primarios de formación de  $\cdot\text{O}_2^-$  son los complejos I y la coenzima Q del complejo III. Adaptado de: Nickel et al., 2014.

Sin embargo, una cierta cantidad de electrones se pierden, sobre todo a través de los complejos I y III, generando  $\cdot\text{O}_2^-$  por la reducción parcial del  $\text{O}_2$ . De hecho, la mitocondria se considera la principal fuente celular de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Nickel et al., 2014). La velocidad de producción de ROS mitocondrial, el nivel de daño oxidativo del ADN mitocondrial, y el grado de insaturación de los ácidos grasos de la membrana (diana potencial de la peroxidación lipídica de las ROS), están inversamente relacionados con la longevidad (Barja, 2004; Szasz et al., 2007).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los complejos 1 y 3 son la principal fuente de  $\cdot\text{O}_2^-$  en la mitocondria. Mientras el complejo III libera  $\cdot\text{O}_2^-$  tanto a la matriz como al espacio intermembrana, el  $\cdot\text{O}_2^-$  producido por el Complejo I es dirigido hacia la matriz (Bartosz, 2009).

La **NADPH oxidasa** es una enzima con múltiples subunidades que cataliza la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  a través de la reducción del  $\text{O}_2$  utilizando NADPH o NADH como donante de electrones:



El ejemplo clásico de esta familia de enzimas es la NADPH oxidasa fagocítica (localizada principalmente en macrófagos y neutrófilos), generando  $\cdot\text{O}_2^-$  durante la fagocitosis. Esta enzima está compuesta por dos subunidades catalíticas que en condiciones de reposo se encuentran unidas a la membrana, p22<sup>phox</sup> y gp91<sup>phox</sup> (donde forman una flavoproteína heterodimérica, el citocromo b558) y tres subunidades citosólicas (p47<sup>phox</sup>, la subunidad reguladora; p40<sup>phox</sup>; y p67<sup>phox</sup>, la subunidad activadora) (Lassègue et al., 2012; Montezano y Touyz, 2012). La activación de esta enzima, que se inicia tras el reconocimiento del patógeno, comienza cuando la proteína Rac fosforila a p47<sup>phox</sup>. Esta proteína sufre un cambio conformacional que le permite interactuar con la subunidad "organizadora" p22<sup>phox</sup>. El p47<sup>phox</sup> se une a la subunidad activadora p67<sup>phox</sup>, y las subunidades citosólicas forman un complejo que se transloca hacia la membrana, donde se asocia con el citocromo b558 (Yung et al., 2006; Paravicini y Touyz, 2008; Frazziano et al., 2012). En estado inactivo, el citocromo b558 se encuentra en el interior de vesículas intracelulares. Las vesículas con el complejo ensamblado son reclutadas a la membrana del fagosoma o la membrana plasmática; y la NADPH oxidasa produce  $\cdot\text{O}_2^-$  por transferencia de electrones desde el NADPH citosólico al  $\text{O}_2$  (Matoba et al., 2000; Bartosz, 2009; Montezano y Touyz, 2012).

Se han caracterizado siete miembros de la familia de las NADPH oxidasas no fagocíticas, conocidos como isoformas de Nox, con diferentes requerimientos para su activación y diferentes patrones de expresión (Griendling, 2006; Paravicini y Touyz, 2008; Madamanchi y Runge, 2013). La Nox1 se localiza en el colon y las células vasculares donde participa en la defensa del huésped y el crecimiento celular; la Nox2 se encuentra en fagocitos; la Nox3 se encuentra en el tejido fetal y en el oído interno adulto, participando en la función vestibular; la Nox4, llamada originalmente "oxidasa renal", se localiza en riñón, tejido vascular, células de músculo liso vascular (MLV) de arterias pulmonares y osteoclastos; y la Nox5 se encuentra en bazo y testículos, y en menor proporción en tejido linfoide, células del tracto gastrointestinal, células vasculares y órganos fetales. Las Duox 1 y 2 son enzimas tiroideas

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

implicadas en la biosíntesis hormonal; también se encuentran de forma abundante en vías aéreas, alvéolos, tracto intestinal, glándulas salivares y próstata (Szasz et al., 2007; Frazziano et al., 2012).

La regulación y función de cada Nox aún no está claro, pero se sabe que son enzimas críticas en las respuestas biológicas normales y que contribuyen a la enfermedad cardiovascular y renal (Paravicini y Touyz, 2008; Frazziano et al., 2012). Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 son los principales componentes de NADPH oxidasa en el sistema vascular. Su expresión y distribución son variables, en función del segmento del lecho vascular y el tipo de célula. Los mecanismos de regulación y vías de señalización para la activación son también diferentes, lo cual es en parte debido a la diversidad de las subunidades citosólicas reguladoras (Lee y Griendling, 2008).

Fisiológicamente, las ROS derivadas de la NADPH oxidasa se han implicado en la regulación del tono vascular directamente mediante la modulación de la vasodilatación o indirectamente a través de la disminución de la biodisponibilidad de NO a través de la reacción con el  $\cdot\text{O}_2^-$  para formar  $\text{ONOO}^-$  (Paravicini y Touyz, 2008).

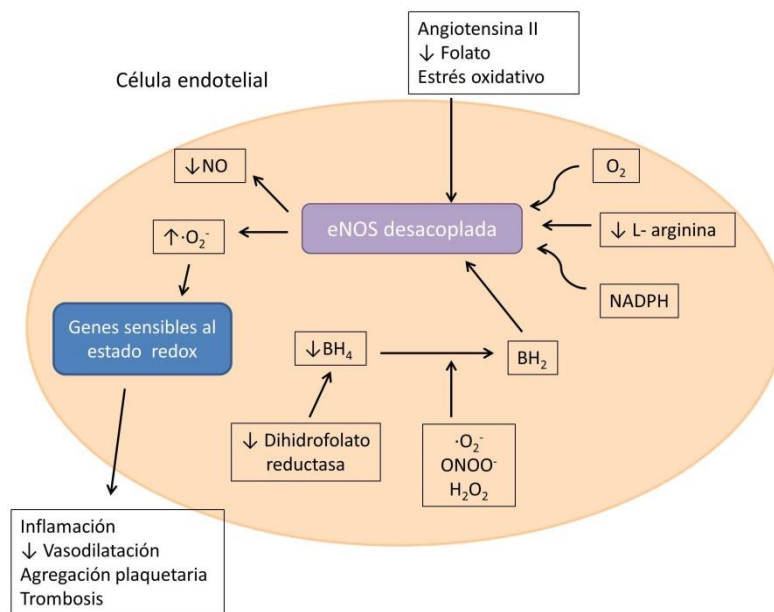
La **xantina oxidoreductasa** (XOR) es una enzima que cataliza los últimos pasos del metabolismo de las purinas: la transformación de hipoxantina y xantina en ácido úrico, generando como subproductos  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\cdot\text{O}_2^-$ . Existen dos isoformas de la XOR: la xantina dehidrogenasa, que reduce principalmente  $\text{NAD}^+$ , y la XO, que reduce  $\text{O}_2$  molecular (Madamanchi y Runge, 2013). Ambas isoenzimas tienen potencial de generar ROS, sin embargo, la XO es *in vivo* la fuente más importante de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\cdot\text{O}_2^-$ . La XOR presenta bajos niveles plasmáticos en mamíferos sanos, pero pueden aumentar considerablemente en condiciones fisiopatológicas. La xantina dehidrogenasa es la enzima predominante en tejidos bien oxigenados, y es susceptible de transformarse en XO por oxidación de residuos de cisteína o por modificaciones proteolíticas irreversibles en situaciones patológicas (Szasz et al., 2007; Lee y Griendling, 2008).

La **NOS** es la enzima responsable de la generación de NO, y tiene tres isoformas: nNOS (isoforma neuronal), iNOS (isoforma inducible) y eNOS (isoforma endotelial) (Xie et al., 1992). En condiciones fisiológicas, esta enzima cataliza la transformación de L-arginina en L-citrulina y NO, utilizando diversos cofactores: NADPH, FAD, flavín mononucleótido, y 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ). Tras la activación, el FAD transfiere electrones desde el NADPH al

flavín mononucleótido, que reduce el hierro del grupo hemo; la  $BH_4$  se une al grupo hemo, catalizando la transformación de L-arginina en NO y citrulina.

La nNOS y la eNOS son constitutivas. En condiciones normales, la eNOS ejerce efectos antiaterogénicos en la pared vascular, incluyendo la inhibición del crecimiento celular, la adhesión de leucocitos, y la agregación plaquetaria. El NO derivado de la eNOS regula el tono y la presión arterial de las células de MLV. En el corazón, la eNOS se expresa en el endocardio y en cardiomiocitos (Madamanchi y Runge, 2013).

Además de las neuronas, la nNOS se expresa en el músculo esquelético, riñón, células endoteliales, células musculares lisas y cardiomiocitos. Esta enzima tiene una función protectora en el corazón; la deficiencia de nNOS disminuye el acoplamiento de la excitación del miocardio a través del aumento de la actividad de la XOR (Madamanchi y Runge, 2013).



**Figura IV. Desacoplamiento de la eNOS.** Cuando se reduce la biodisponibilidad de  $BH_4$  y/o L-arginina, cambia el balance del estado redox favoreciendo la producción de  $\cdot O_2^-$  en lugar de NO, lo que produce un incremento de la formación de ROS endotelial y la activación de genes sensibles al estado redox que contribuyen a la disfunción endotelial. Adaptado de: Montezano y Touyz, 2012.

Si la concentración de arginina o de  $BH_4$  es baja o la  $BH_4$  se oxida, esta enzima se transforma en su forma desacoplada (Kuzkaya et al., 2003), catalizando la transferencia de electrones desde el NADPH al  $O_2$  y produciendo  $\cdot O_2^-$ , cuya interacción con el NO genera  $ONOO^-$  (Landmesser et al., 2003; Yung et al., 2006). La  $BH_4$  es altamente susceptible a la oxidación por ROS; por lo tanto, el estrés oxidativo es un mecanismo importante para el desacoplamiento de la eNOS (Kuzkaya et al., 2003). El  $H_2O_2$  derivado de la NADPH oxidasa puede producir la

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

regulación a la baja de la enzima dihidrofolato reductasa, limitante en la síntesis de BH<sub>4</sub> (Lee y Griendling, 2008). Este desacoplamiento contribuye al aumento de la producción de ROS y la disminución de la formación de NO y la consiguiente disfunción endotelial (Montezano y Touyz, 2012; Majzunova et al., 2013).

Las **LOX** son otra fuente importante de producción de ROS en la pared vascular, que oxidan los ácidos grasos poliinsaturados que se liberan de la membrana celular en condiciones inflamatorias (Dobrian et al., 2011). Las LOX se nombran por el átomo de carbono numerado del ácido graso poliinsaturado que se oxida. La 5-LOX y 12/15-LOX son importantes en la función cardiovascular y en la aterosclerosis debido a su expresión en la pared vascular y las células inflamatorias (Funk et al., 2002; Madamanchi y Runge, 2013).

La **mieloperoxidasa** (MPO) es una enzima con acción proinflamatoria y proaterogénica por promoción del reclutamiento de leucocitos en los sitios de inflamación por su carga superficial positiva (Klinke et al., 2011); generando oxidantes que inician la peroxidación lipídica e inducen la modificación de residuos de aminoácidos en las proteínas (Thomas et al., 2008). La MPO induce carbamilación proteica en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los sitios de inflamación y en las placas ateroscleróticas (Wang et al., 2007). Un incremento en la LDL carbamilación por la MPO en lesiones ateroscleróticas humanas provoca la acumulación de colesterol y cuerpos lipídicos en los macrófagos a través de una mayor unión al receptor de LDL (Holzer et al., 2011).

La **COX**, de la que existen dos isoenzimas, COX-1 y COX-2, cataliza la formación de prostaglandinas (PG), tromboxano (TX) y levuloglandinas. Las PG son mediadores autocoides que afectan a prácticamente todos los procesos fisiológicos y patológicos conocidos a través de su interacción reversible con receptores de membrana acoplados a proteína G (Fitzpatrick, 2004).

Los prostanoides son moduladores críticos del tono vascular y la agregación plaquetaria en condiciones fisiológicas y patológicas. En vasos sanguíneos sanos, la mayoría de los prostanoides son producidos por la isoforma constitutiva COX-1. La COX-2 es inducida por estímulos inflamatorios y otros factores como la angiotensina II (Ang II) o la endotelina-1 (ET-1) (Tsatsanis et al., 2006; Beltrán et al., 2009; Hernanz et al., 2014). Además, la COX-2 se expresa constitutivamente en condiciones patológicas en varios órganos y tipos de células, incluyendo la pared vascular (Féléto et al., 2011).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Después de la síntesis inicial de la  $PGH_2$ , la producción de los diferentes prostanoides depende de la actividad de sintasas específicas. Los prostanoides tienen diferentes efectos vasculares en función de la activación de receptores específicos. La unión de la  $PGE_2$  a sus receptores EP1 y EP3 induce vasoconstricción, mientras que EP2 y EP4 producen vasodilatación. Los receptores EP también influyen en la agregación plaquetaria, la migración de monocitos y macrófagos, la proliferación y migración de células musculares lisas o la producción vascular de citoquinas (Feletou y Vanhoutte, 1988). A través del receptor de prostaciclina (IP), la  $PGI_2$  induce vasodilatación e inhibe la activación plaquetaria (Mitchell et al., 2008). El receptor de TX (TP) está implicado en la agregación plaquetaria, la contracción del músculo liso, la expresión de moléculas de adhesión y la adhesión e infiltración de monocitos/macrófagos (Nakahata, 2008). Aunque el  $TXA_2$  es el ligando fisiológico de los receptores TP, la  $PGH_2$  y otras prostaglandinas también pueden activar este receptor (Félétou et al., 2010; Hernanz et al., 2014).

### 1.2.2. Mecanismos celulares de la destrucción de ROS

En cantidades traza, las ROS actúan como moléculas de señalización en condiciones fisiológicas, pero la producción excesiva de ROS provoca procesos celulares patológicos. Los antioxidantes son moléculas encargadas de proteger las funciones celulares de la acción de las ROS, y se definen como sustancias que, cuando se encuentran frente a sustratos oxidables, son capaces de impedir o retrasar significativamente la oxidación de dicho sustrato. Por ello, los antioxidantes controlan de forma precisa el estado redox intracelular. Estos mecanismos son diferentes en los compartimentos intra- y extracelular y pueden ser tanto enzimáticos como no enzimáticos. Los principales antioxidantes enzimáticos vasculares son la SOD, la catalasa, y la glutatión peroxidasa (GPx) (Paravicini y Touyz, 2008). Entre los mecanismos no enzimáticos, se encuentran una gran variedad de sistemas redox de defensa incluyendo *scavengers* antioxidantes, como las vitaminas E y C, el glutatión (GSH)/glutatión disulfuro oxidado (GSSH), las formas oxidada y reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH/NAD<sup>+</sup>) y la tiorreoxina (Trx) (Paravicini y Touyz, 2008; Jeong et al., 2012).

La **SOD** presenta un papel fundamental en la regulación de los niveles de ROS, siendo responsable de la conversión de  $\cdot O_2^-$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$ , reacción que, aunque se produce de manera espontánea, es significativamente acelerada por esta enzima. Además, es el principal sistema de defensa intracelular para eliminar  $\cdot O_2^-$  en células vasculares. Existen tres tipos de SOD: la

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

SOD citosólica (SOD1 o CuZnSOD), homodimérica; la SOD mitocondrial (SOD2 o MnSOD), tetramérica; y la SOD extracelular (SOD3 O EC-SOD), tetrámero con un dominio C terminal de unión a heparina (Szasz et al., 2007). La EC-SOD es la principal SOD vascular. Es producida y secretada por las células musculares lisas y del endotelio vascular, y juega un papel importante en la regulación del estado oxidativo en el intersticio vascular (Wassmann et al., 2004; Paravicini y Touyz, 2008). Constituye una defensa frente al  $\cdot\text{O}_2^-$  presente en el espacio extracelular (Yung et al., 2006). La MnSOD se encuentra en las mitocondrias y dismuta el  $\cdot\text{O}_2^-$  derivado de la cadena respiratoria (Sobey et al., 1997), estando implicada en la prevención del acúmulo de  $\cdot\text{O}_2^-$  y subsiguiente disfunción mitocondrial (Shen et al., 2006; Shao et al., 2012). La Cu, Zn-SOD se localiza principalmente en el citosol, en el núcleo y, en menor medida, en la mitocondria, dismutando el  $\cdot\text{O}_2^-$  y prolongando la vida media del NO. La actividad de la Cu, Zn-SOD representa aproximadamente el 50-80% de toda la actividad SOD en la pared vascular.

La **catalasa** es una enzima homotetramérica intracelular que cataliza la conversión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua y  $\text{O}_2$ , localizada principalmente en peroxisomas. Es una enzima especialmente importante cuando el nivel de estrés oxidativo es elevado, y protege a la célula del  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido en el interior celular. Su papel es fundamental en casos en que el nivel de GSH es bajo, o la actividad de la GPx se encuentra reducida (Szasz et al., 2007; (Paravicini y Touyz, 2008).

El **GSH** es especialmente abundante en el citosol, núcleo y mitocondria y es el principal antioxidante soluble en estos compartimentos celulares. Se sintetiza en el citosol por la acción secuencial de la glutamato cisteína ligasa y la glutation sintetasa, requiriéndose para su presencia en la mitocondria el transporte a través de su membrana interna (Shen et al., 2005). En el núcleo, el GSH mantiene el estado redox de proteínas críticas para la expresión y reparación del DNA (Nogueira et al., 2004).

Las principales funciones protectoras del GSH frente al estrés oxidativo son: actuar como cofactor de varias enzimas desintoxicantes contra el estrés oxidativo, por ejemplo, la GPx o la glutation transferasa; participar en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; participar en la detoxificación de radicales  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y peróxidos lipídicos a través de la acción catalítica de la GPx; y regenerar los antioxidantes más importantes, las vitaminas C y E, a sus formas activas (Valko et al., 2007).

La GPx transfiere electrones desde la forma reducida del GSH al  $\text{H}_2\text{O}_2$  o a peróxidos lipídicos con formación de agua,  $\text{O}_2$  y alcoholes lipídicos, con la oxidación GSH a GSSH;

posteriormente, el GSSH es reducido por la glutathion reductasa. El GSH desempeña un papel fundamental en la regulación del estado redox intracelular de las células vasculares, proporcionando equivalentes reducidos de muchas vías bioquímicas. El sistema de GPx/glutathion reductasa es especialmente importante cuando existen bajos niveles de estrés oxidativo (Szasz et al., 2007; Paravicini y Touyz, 2008).

Las **Trx 1 y 2** son enzimas presentes de forma ubicua en células de mamífero. Actúan como importantes antioxidantes en miocitos cardíacos, con actividad disulfuro reductasa (Nordberg y Arnér, 2001). La Trx1 también funciona como un intermedio de señalización que detecta el desequilibrio del estado redox y transduce señales a otros efectores, incluyendo factores de transcripción y quinasas (Shao et al., 2012).

**Secuestradores –“scavengers”- de ROS.** Estas moléculas, como la vitamina C y E, no son enzimas, y por tanto se necesita una nueva molécula por cada anión  $\cdot\text{O}_2^-$  que es limpiado (Szasz et al., 2007).

### 1.2.3. ROS y mecanismos de mantenimiento de la "homeostasis redox"

Las concentraciones de ROS en estado estacionario vienen determinadas por el equilibrio entre su tasa de producción y su tasa de eliminación por los sistemas antioxidantes. Por lo tanto, cada célula presenta un *estado redox* característico que determina la funcionalidad celular (Schafer y Buettner, 2001).

La homeostasis redox intracelular viene determinada principalmente por el GSH y la Trx. El GSH representa el principal tampón redox celular y por lo tanto es un indicador representativo del medio ambiente redox de la célula. En condiciones de estrés oxidativo, aumenta el contenido de GSSH, esto a su vez aumenta el contenido de puentes disulfuro en las proteínas (Drogue, 2002).

El término *señalización redox* describe un proceso en el que niveles fisiológicos de ROS inducen modificaciones proteicas discretas, específicas de lugar y reversibles, a través de reacciones redox (Foster et al., 2009). El estado redox es diferente para células en crecimiento activo, confluentes, diferenciadas o apoptóticas, y la producción de ROS puede cambiar el estado redox del compartimiento celular en el que se produce esta reacción (Bartosz, 2009). La señalización redox requiere que el estado estacionario de "equilibrio redox" sea alterado

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

temporalmente hacia condiciones más oxidantes, ya sea por un aumento en la formación de ROS o una disminución en la actividad de los sistemas antioxidantes. El aumento regulado de radicales libres conduce a un desequilibrio temporal que representa las bases fisiológicas de la regulación redox (Droge, 2002). En condiciones patológicas, sin embargo, concentraciones anormalmente grandes de ROS pueden conducir a cambios permanentes en la transducción de señales y la expresión génica, típicos de los estados de enfermedad.

Las ROS pueden modular la actividad de una gran variedad de proteínas intracelulares y vías de señalización, y esta señalización redox está espacial y temporalmente regulada para generar efectos específicos. Los mecanismos principales por los que las ROS generan efectos celulares específicos son las modificaciones covalentes de grupos tiol de residuos de cisteína dentro de los centros activos y alostéricos de las proteínas, la oxidación de proteínas que contienen centros hierro-azufre, y la S-glutathionilación (unión disulfuro entre el tiol de la proteína y el GSH) (Cave et al., 2006). La señalización redox puede inducir efectos agudos, como cuando la las proteínas diana son canales iónicos o proteínas contráctiles, o efectos a largo plazo, cuando la diana es una proteína quinasa (PK) o un factor de transcripción (Madamanchi y Runge, 2013).

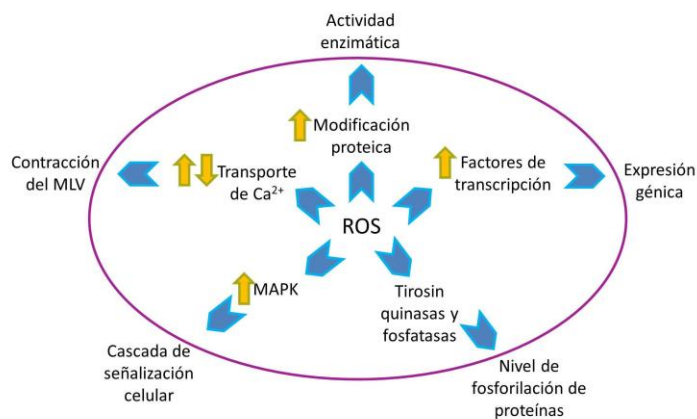
Aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\cdot\text{O}_2^-$  son oxidantes de potencia relativamente baja, otras ROS pueden producir daños irreversibles a las distintas macromoléculas (Bartosz, 2009). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de inducir modificaciones covalentes reversibles en grupos tiol de residuos de cisteína localizados en centros activos y alostéricos de proteínas específicas, produciendo alteraciones en su actividad y función, lo que influencia una gran variedad de cascadas de trasducción de señales y diversos procesos fisiológicos. El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a concentraciones micromolares, oxida los grupos tiol de residuos de cisteína para generar primero ácido sulfénico (SOH) y luego disulfuros. Los enlaces disulfuro puedan ser reducidos por glutaredoxinas, Trx o GSH, por lo que esta modificación es reversible (Townsend, 2007). Además, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede a su vez oxidarlos, generando ácidos sulfínicos ( $\text{SO}_2^-$ ) y sulfónicos ( $\text{SO}_3^-$ ) (Denu y Tanner, 1998; Bartosz, 2009). Los ácidos sulfónicos son un ejemplo de modificación irreversible de proteínas y un marcador de estrés oxidativo acumulado (Lei et al., 2008; Lim et al., 2008). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de modificar diferentes proteínas entre las que se incluyen fosfatasa, factores de transcripción, canales iónicos, enzimas antioxidantes y metabólicas, proteínas estructurales y proteínas quinasas entre otros (Thomas et al., 2008).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El ciclo celular se caracteriza por fluctuaciones en el entorno redox de una célula, mediadas, particularmente, por cambios en la concentración intracelular de GSH (Schafer y Buettner, 2001). Se ha demostrado que el GSH desempeña un papel en el rescate de células de la apoptosis; el agotamiento de GSH, que conduce a un entorno celular más oxidante, es concomitante con el inicio de la apoptosis. Generalmente, un entorno más reductor de la célula (mantenido por niveles elevados de GSH y Trx) estimula la proliferación celular, y un ligero cambio hacia un entorno ligeramente oxidante inicia la diferenciación celular. Un cambio hacia un entorno más oxidante en la célula conduce a la apoptosis (Valko et al., 2007).

### 1.3. Dianas moleculares de las especies reactivas de O<sub>2</sub>

Las ROS generadas en el interior de las células inician eventos de señalización celulares específicos. Muchas ROS, como el  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{ONOO}^-$ , presentan una vida media muy corta y no pasan eficazmente de una célula a otra. Por tanto, incluso cuando el  $\cdot\text{O}_2^-$  es producido en el interior celular, no puede ejercer un efecto paracrino. Sin embargo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula estable y sin carga. Las ROS ejercen diferentes acciones en células endoteliales y células de MLV ya que afectan a diversas moléculas de señalización incluyendo factores de transcripción, PTK, PTP y MAPK, así como canales y transportadores iónicos (Yung et al., 2006).



**Figura V. Moléculas diana de las ROS.**

Las ROS regulan: a) la actividad de diversos factores de transcripción, que están implicados en la regulación de la expresión génica; b) la actividad de las PTK y PTP, que mantienen el nivel de fosforilación proteica; c) las MAPK son otra diana de las ROS, que participan en la transducción de señales; d) las ROS participan en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  regulando la contracción muscular; e) las ROS están implicadas en la modificación proteica, afectando a su conformación y actividad. Adaptado de: Yung et al., 2006.

Las **MAPK** son componentes clave de las vías de señalización activadas por receptores acoplados a proteína G, receptores de tirosin quinasa, integrinas y citoquinas. Son una familia de serin/treonin quinasa que participan en diversas cascadas de trasducción de señales

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

extracelulares de la membrana celular al núcleo; que controlan la proliferación, la diferenciación y la muerte celular (Pearson et al., 2001).

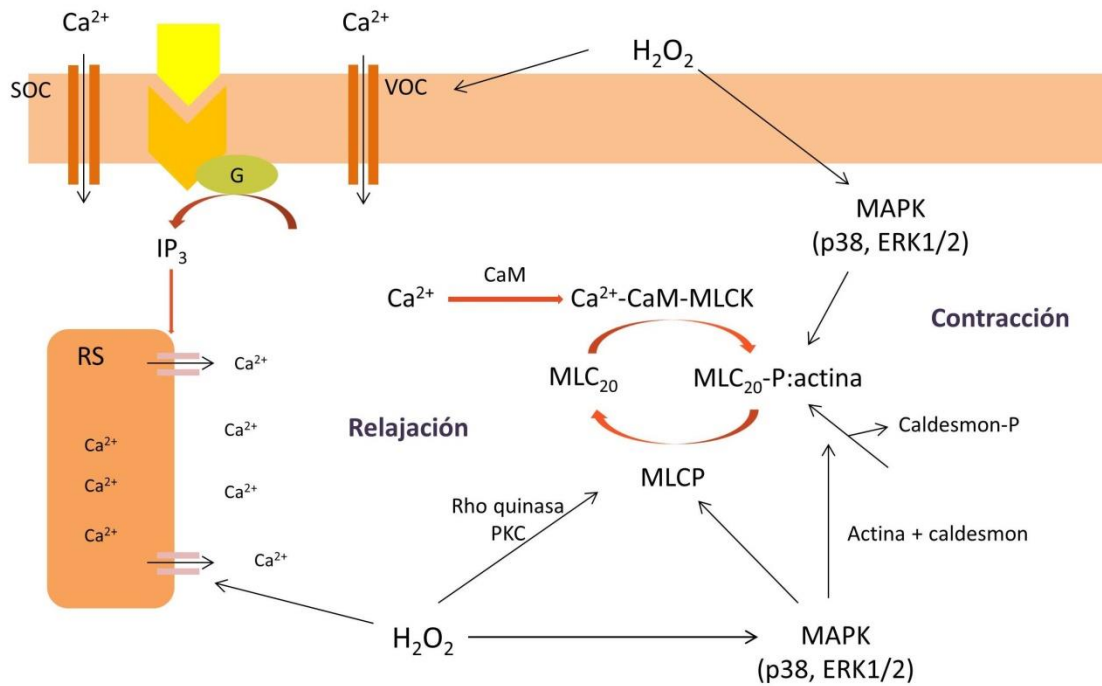
En mamíferos, las MAPK mejor caracterizadas son la quinasa regulada por señales extracelulares tipo 1 y 2 (ERK 1/2 MAPK), la p38 MAPK y la quinasa del extremo *N*-terminal de c-Jun (JNK). La activación de las MAPK es dependiente de una cascada de fosforilaciones, que permite tanto la interacción con múltiples vías de señalización como la potencial amplificación de la señal. Las principales MAPK presentes en el sistema vascular, ERK 1/2, JNK, p38 MAPK, y ERK tipo 5, son activadas por factores de crecimiento como la Ang II o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Sundaresan et al., 1995; Eguchi et al., 2001).

La activación de las MAPK y la transducción de señales dependen de una serie de fosforilaciones que permiten la interacción de múltiples vías de señalización. Las cascadas de fosforilación de las MAPK se pueden regular negativamente a través de MAP fosfatasas que desfosforilan (desactivan) las MAPK (Boutros et al., 2008). Las vías de las MAPK están implicadas en la regulación de la proliferación, la diferenciación, la transformación y la muerte celular, así como en la vasoconstricción (Majzunova et al., 2013).

La cascada de la ERK está implicada principalmente en la proliferación, la diferenciación, el crecimiento y la supervivencia celular, JNK en la apoptosis/inflamación y p38 MAPK en la motilidad celular y las respuestas inflamatorias (Qi y Elion, 2005; Bretón-Romero y Lamas, 2014).

Las MAPK son susceptibles de ser activadas por las ROS o por cambios leves del estado redox intracelular. Por ejemplo, en células endoteliales, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de activar la p38 MAPK, y en células de MLV, la activación de la p38 MAPK es dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posiblemente derivado de la NADPH oxidasa (Viedt et al., 2000). La activación de la ERK1/2 por las ROS está menos caracterizada; esta enzima es fosforilada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y aumenta la permeabilidad endotelial a solutos (Kevil et al., 2000; Paravicini y Touyz, 2006; Yung et al., 2006).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



**Figura VI. Mecanismos de transducción de señales de contracción del músculo liso y mecanismo de modulación del  $H_2O_2$ .** La despolarización y la activación de los canales de  $Ca^{2+}$  VOC o la interacción ligando-receptor y la estimulación de la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular de los depósitos por activación secundaria de los canales SOC producen aumentos en el  $Ca^{2+}$  intracelular que conducen a la activación de la  $MLC_{20}$  por la  $Ca^{2+}$ -calmodulina-quinasa de cadena ligera de miosina ( $Ca^{2+}$ - $CaM$ -MLCK).  $MLC_{20}$ -P se une a la actina y se produce la contracción.  $MLC_{20}$ -P es defosforilado por la fosfatasa de cadena ligera de miosina (PCML), lo que lleva a la relajación. El  $H_2O_2$  es capaz de aumentar el  $Ca^{2+}$  intracelular a través de los canales VOC y la activación de la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular de los depósitos. También puede activar las MAPK y la Rho-quinasa, que conducen al incremento de la contracción del MLV. Por otra parte, las MAPK también parecen estar implicadas en la fosforilación de caldesmon, favoreciendo la interacción  $MLC_{20}$ -P: actina. Adaptado de: Paravicini y Touyz, 2006.

Las **PTK y PTP** son enzimas que participan en la fosforilación/defosforilación de proteínas. La fosforilación de residuos de tirosina constituye un importante mecanismo de modificación post-traslacional de proteínas, y desempeña un papel fundamental en la regulación de la proliferación, diferenciación, migración y transformación celular (Anderson et al., 2001). Las PTK normalmente se encuentran en estado de reposo y se activan en el momento que se producen cambios funcionales en la membrana. Los receptores de las PTK comprenden el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del PDGF. Las respuestas clásicas mediadas por factores de crecimiento implican la formación de  $H_2O_2$ , que participa en la transducción de señales estimuladas por ligando (Sundaresan et al., 1995). Las ROS pueden activar los receptores del EGF y del PDGF, activando una cascada de señalización

que en última instancia conlleva la activación de las MAPK en las células de MLV (Saito y Berk, 2001).

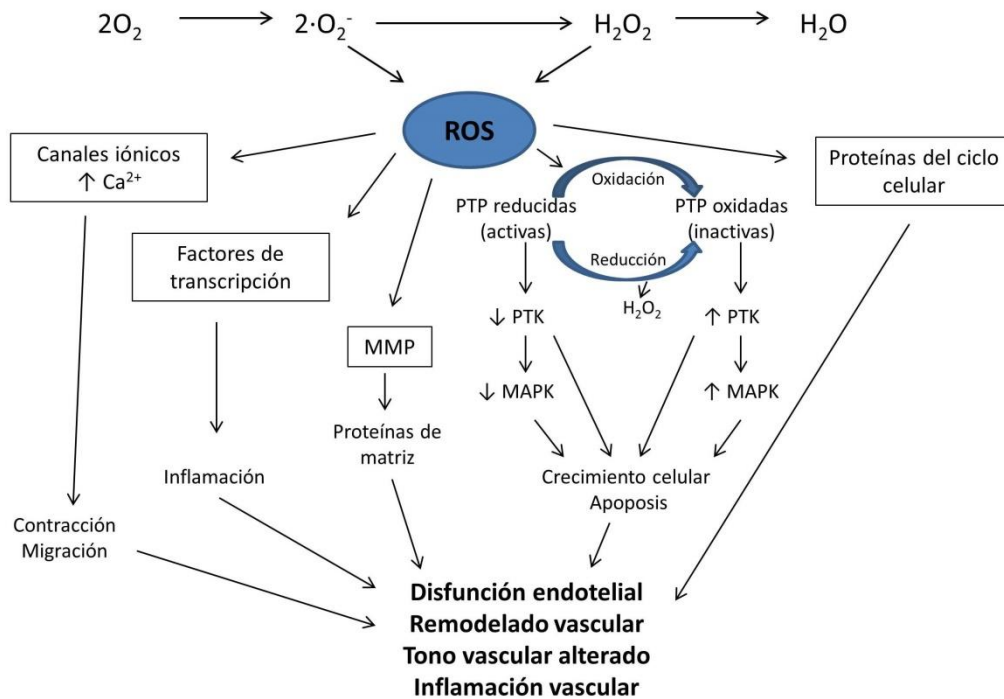
Las PTP constituyen las dianas moleculares directas mejor caracterizadas de las ROS. La activación e inactivación de las fosfatasa se regula a través de señales extracelulares entre las que se incluyen las producidas por la Ang II y el EGF, y las ROS desempeñan un importante papel como segundos mensajeros en este proceso (Murphy et al., 2001). Existe una correlación entre la magnitud y duración del incremento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la tirosin fosforilación de proteínas en células de MLV tratadas con diversos factores de transcripción, lo que podía ser debido a la inactivación transitoria de las PTP. La rápida inactivación de estas proteínas con bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se debe a la oxidación de un residuo cisteína esencial (Moskovitz et al., 2001; Madamanchi y Runge, 2013).

**Factores de transcripción.** La regulación redox de factores de transcripción juega un papel importante en la homeostasis y en la patogénesis vascular (Madamanchi y Runge, 2013). El factor nuclear Kappa B (NF-KB) es un factor de transcripción que regula la expresión de diversos genes, incluidos algunos que codifican interleuquinas (IL) y moléculas de adhesión (Gordon et al., 2011). El NF-KB normalmente se encuentra unido a sus inhibidores en el citoplasma, y es activado por las ROS a través de la oxidación de residuos de cisteína o de la degradación del inhibidor de NF-KB, haciendo que se trasloque hacia el núcleo celular y permitiendo su unión al ADN. Otro factor de transcripción redox-sensible es la proteína activadora 1 (Turner y Tjian, 1989), que participa en el crecimiento y diferenciación de la pared vascular; y que es regulado por las ROS a través de varios mecanismos que incluyen la participación de las Trx y la cascada JNK (Xanthoudakis y Curran, 1992; Yung et al., 2006).

Las **metaloproteinasas** (MMP) son una familia de enzimas capaces de degradar la matriz extracelular. Estas enzimas se secretan como proenzimas inactivas, y algunas presentan un papel crítico en el remodelado vascular (Lehoux et al., 2004). La actividad de las MMP está estrechamente controlada a nivel de transcripción, síntesis proteica y formación de zimógenos activos. Las ROS pueden activar estas enzimas en las células de MLV, lo que indica que las vías de señalización sensibles al estado redox están implicadas en la modulación de la matriz extracelular (Paravicini y Touyz, 2006).

Las ROS son capaces de activar **canales iónicos**, un proceso crítico para algunos de sus efectos vasoactivos. En concreto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido propuesto como un potencial factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) debido a su capacidad de activar canales de K<sup>+</sup>

en el sistema vascular. Además, los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) pueden ser activados por  $H_2O_2$  en determinados lechos vasculares, incluido el cerebral, coronario y mesentérico (Paravicini y Touyz, 2006).



**Figura VII. Vías de señalización dependientes del estado redox en células de MLV.** Las ROS intracelulares modifican la actividad de las PTK y las MAPK, principalmente mediante la oxidación- reducción de las PTP. Las ROS también afectan la expresión génica mediante la activación de factores de transcripción y estimulan canales iónicos. La activación de estas vías resulta en numerosas respuestas celulares que, si no están bien reguladas, pueden producir alteraciones vasculares. Adaptado de: Paravicini y Touyz, 2006.

**Sistemas de transporte de  $Ca^{2+}$ .** Los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular regulan de forma crucial el tono en las células de MLV, y están modulados por las ROS. El  $\cdot O_2^-$  y el  $H_2O_2$  aumentan la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en las células de MLV y las células endoteliales (Lounsbury et al., 2000). Además, el  $ONOO^-$  es capaz de inhibir la recaptación de  $Ca^{2+}$  en arterias coronarias, probablemente a través de la alteración de la función de la bomba de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (RS) (Grover et al., 2003). Estudios más recientes han descrito que las ROS aumentan el flujo de  $Ca^{2+}$  en las células de MLV (Tabet et al., 2004). Las interacciones entre las ROS y los sistemas de transporte de  $Ca^{2+}$  dentro de la célula se describirán en detalle en el apartado 2 de esta revisión.

#### 1.4. Procesos fisiológicos regulados por las ROS

En la actualidad se admite que las ROS, originalmente consideradas como inductoras de daño celular, tienen importantes acciones fisiológicas (Droge, 2002). Un gran número de funciones fisiológicas están controladas a través de las vías de señalización sensibles al estado redox. Entre éstas, por ejemplo, se incluyen:

- **La producción de NO regulada por el estado redox.** La iNOS se expresa en los macrófagos después de la estimulación por lipopolisacáridos, citocinas y otros agentes. La expresión de la iNOS está regulada a nivel transcripcional y postranscripcional por vías de señalización que implican al factor de transcripción dependiente del estado redox NF- $\kappa$ B o a las MAPK (Valko et al., 2007).
- **La producción de ROS por la NADPH oxidasa fagocítica (“estallido oxidativo”).** El estallido oxidativo se caracteriza por la producción masiva de ROS en un ambiente inflamatorio y desempeña un papel clave en la defensa contra patógenos. En un ambiente inflamatorio, los neutrófilos y macrófagos activados producen grandes cantidades de  $\cdot\text{O}_2^-$  y otras ROS a través de la isoforma fagocítica de la NADPH oxidasa (Keisari et al., 1983). Por ejemplo, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  bajo tales condiciones puede alcanzar un nivel de 10-100  $\mu\text{M}$ . Así, el papel fisiológico de la NADPH es actuar como un agente de defensa (Tauber et al., 1983). Los neutrófilos y macrófagos estimulados también pueden generar  $\text{O}_2$  a través de reacciones que implican la NADPH oxidasa o la MPO (Valko et al., 2007).
- **La producción de ROS por NADPH oxidasas en células no fagocíticas.** Existen diversos tipos de células no fagocíticas, como fibroblastos, células de MLV, miocitos cardiacos y células endoteliales, capaces de producir ROS a través de la NADPH oxidasa para regular las cascadas de señalización intracelulares (Jones et al., 1996). Las NADPH oxidasas de las células vasculares producen  $\cdot\text{O}_2^-$  y otras ROS, que a su vez activan múltiples vías de señalización intracelulares y que pueden, asimismo actuar en la regulación fisiológica del tono vascular (Montezano y Touyz, 2012). Por tanto las ROS juegan un papel importante en la regulación del funcionamiento de la célula cardiaca y vascular (Griendling et al., 2007).
- **La regulación del tono vascular mediada por GMPc.** La enzima guanilato ciclasa (GS) soluble puede ser activada tanto por  $\text{H}_2\text{O}_2$  como por NO (Wolin et al., 1999). Su producto, el GMPc modula la función de proteínas quinasas, canales iónicos, y otras dianas

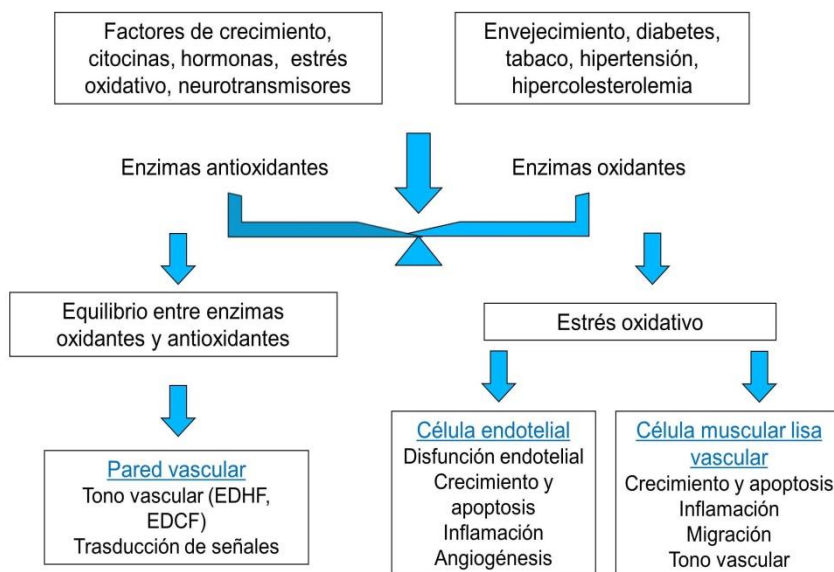
fisiológicas, de las cuales las más importantes son la regulación del tono del músculo liso y la inhibición de la adhesión plaquetaria (Valko et al., 2007; Neo et al., 2010).

- **La producción de ROS como sensor de cambios en la concentración de O<sub>2</sub>.** En los organismos superiores, la homeostasis del O<sub>2</sub> se conserva a través de la regulación estricta de la masa de glóbulos rojos y la ventilación respiratoria (Acker y Xue, 1995). Varias proteínas productoras de ROS relacionadas con el citocromo b detectan los cambios en la concentración de O<sub>2</sub>. Además, el cambio en la tasa de producción mitocondrial de ROS puede estar implicado en la detección de O<sub>2</sub> por los cuerpos carotídeos. También la producción de ciertas hormonas, como la eritropoyetina o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), se regulan en respuesta a cambios en la presión de O<sub>2</sub> (Neo et al., 2010; Perez-Vizcaíno et al., 2010; Weir y Archer, 2010).
- **La regulación redox de la adhesión celular.** La adhesión celular participa en procesos como la embriogénesis, el crecimiento y la diferenciación celular o la reparación de heridas, y los cambios en las propiedades adhesivas de las células y tejidos están regulados estrechamente a través de mecanismos redox (Albelda et al., 1994). Las ROS también inducen la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales (Schaller et al., 1992; Valko et al., 2007).
- **La regulación redox de la respuesta inmune.** La respuesta inmune es un proceso regulado por el estado redox; la activación de los linfocitos T se ve significativamente incrementada por las ROS o por un cambio en el estado redox del GSH intracelular. Algunas funciones de las células T, como la producción de IL-2, pueden ser inducidas por concentraciones fisiológicamente relevantes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Los et al., 1995). El estado redox intracelular también modula las funciones inmunológicas de los macrófagos (Valko et al., 2007).
- **La apoptosis inducida por ROS.** La muerte celular programada (apoptosis) es necesaria tanto para el adecuado desarrollo como para destruir las células que representan una amenaza a la integridad del organismo. La decisión de una célula de suicidarse se basa en el equilibrio entre la retirada de las señales positivas (los necesarios para la supervivencia continuada, por ejemplo, factores de crecimiento neuronales, IL-2, etc) y la recepción de señales negativas (por ejemplo, aumento de los niveles de oxidantes dentro de la célula, el daño al ADN ejercido por oxidantes, u otros efectos nocivos tales como la irradiación de alta energía o agentes quimioterápicos) (Hengartner, 2000). Las células endoteliales son

resistentes a la inducción de la apoptosis por NO; que se ha relacionado con altos niveles intracelulares de GSH (Albina y Reichner, 1998; Valko et al., 2007).

### 1.5. ROS y función vascular

Las ROS en el sistema vascular juegan un papel fisiológico en el control de la función endotelial, el tono y la integridad vascular, y un papel fisiopatológico en la inflamación, la hipertrofia, la apoptosis, la contracción, la migración, la fibrosis, y la angiogénesis, factores importantes que contribuyen a la disfunción endotelial, el incremento en la vasoconstricción y el remodelado arterial en el curso de la enfermedad cardiovascular (Drogue, 2002; Lassègue et al., 2012; Montezano y Touyz, 2012; Satoh et al., 2014). Las respuestas celulares mediadas por las ROS dependen de la localización subcelular, la identidad y cantidad de oxidantes producidos, y de la cinética de producción de ROS.



**Figura VIII. ROS en la pared vascular.** En condiciones fisiológicas, las enzimas oxidantes y antioxidantes están en equilibrio con los niveles de ROS necesarios para una función vascular normal. En situaciones patológicas, hormonas, factores de crecimiento, y otros factores de riesgo producen estrés oxidativo en la pared vascular incrementando la actividad o expresión de enzimas oxidantes o disminuyendo la de enzimas antioxidantes. Adaptado de: Yung et al., 2006.

#### 1.5.1. ROS y células endoteliales

El endotelio comprende una capa sencilla de células escamosas que recubre la superficie interna de todos los vasos sanguíneos, formando una interfase entre la sangre circulante y la pared vascular. Este órgano monocapa metabólicamente activo está

constantemente expuesto a diferentes estímulos biomecánicos y bioquímicos a los que responde mediante la preservación de la integridad y la homeostasis de la función vascular (Cai y Harrison, 2000). Las ROS desempeñan un papel clave como reguladores fisiológicos de las vías de señalización intracelulares que participan en la función del endotelio vascular (Ray et al., 2012; Bretón-Romero y Lamas, 2014).

El endotelio sano previene la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos y controla la permeabilidad vascular (Yetik-Anacak y Catravas, 2006; Mensah, 2007). Es muy sensible a los estímulos mecánicos (estiramiento, estrés de cizalla o *shear stress*, presión), agentes humorales (Ang II, ET-1, aldosterona, bradicinina, TX) y factores químicos (ROS, glucosa), liberando mediadores endoteliales, como NO, PGI<sub>2</sub>, factor activador de plaquetas, péptido natriurético atrial de tipo C y ET-1 para mantener el tono vascular y la integridad estructural (Fleming y Busse, 2003; Lam et al., 2006). Las células endoteliales también controlan la coagulación a través de la producción de moléculas con actividad anticoagulante, como el activador tisular del plasminógeno, uroquinasa y trombomodulina (Libby et al., 2006; Montezano y Touyz, 2012). Las células endoteliales juegan un papel clave en la reacción inmune a través de la regulación del reclutamiento de leucocitos, por inducción de moléculas de adhesión leucocitarias, o por la activación inflamatoria del endotelio en respuesta a citoquinas inflamatorias o a condiciones metabólicas alteradas (Pober y Sessa, 2007; Prieto et al., 2014).

A su vez, las ROS afectan muchas funciones de las células endoteliales, de las que la mejor caracterizada es la vasodilatación dependiente del endotelio. Las ROS también estimulan el crecimiento de las células endoteliales y la apoptosis, e incrementan la adhesión de monocitos desempeñando por tanto un papel en la angiogénesis (Yung et al., 2006).

En el endotelio, la generación intracelular de ROS se produce principalmente a través de cuatro sistemas enzimáticos, que incluyen las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa, la XOR, la eNOS y el complejo respiratorio mitocondrial (Cai y Harrison, 2000; Li y Shah, 2004); si bien también se ha descrito a participación de otras enzimas como la LOX, la COX o el citocromo P450 (Cai, 2005). Se ha descrito que la NOX4 (la isoforma más abundante de la NADPH oxidasa en el endotelio) produce directamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Takac et al., 2011); aunque también se ha propuesto que el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por la NOX4 se convierte rápidamente en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Serrander et al., 2007; Bretón-Romero y Lamas, 2014).

El  $H_2O_2$  modula diferentes aspectos de la función de las células endoteliales, incluyendo el crecimiento endotelial y la proliferación celular, la supervivencia, la vasodilatación dependiente del endotelio, la reorganización del citoesqueleto, la respuesta inflamatoria y el remodelado vascular del endotelio, entre otros (Cai, 2005). Para el mantenimiento de la homeostasis vascular es esencial una regulación estrictamente controlada de  $H_2O_2$ ; una señalización redox aberrante, por lo general inducida por una producción excesiva de ROS y/o por la disminución en la actividad antioxidante, puede contribuir a una alteración en la función vascular y conducir a enfermedad vascular (Ramachandran et al., 2002; Bretón-Romero y Lamas, 2014).

El crecimiento y la supervivencia de las células endoteliales dependen de varios factores relacionados con la producción intracelular de  $\cdot O_2^-$  y  $H_2O_2$  (Abid et al., 2000). Se ha demostrado que las ROS median numerosos efectos angiogénicos como la migración o la proliferación, a través de una regulación estricta entre el  $H_2O_2$  y el VEGF (Ushio-Fukai y Alexander, 2004). Por un lado, el  $H_2O_2$  regula al alza la producción de mRNA y la expresión de proteínas del VEGF y la activación del receptor del VEGF (Colavitti et al., 2002; Ushio-Fukai et al., 2002), induciendo respuestas relacionadas con la angiogénesis. Sin embargo, el VEGF también es capaz de activar una de las principales fuentes de ROS en las células endoteliales vasculares, la NADPH oxidasa (Griendling et al., 2000). Es importante señalar que estos efectos beneficiosos sobre el sistema vasculatur sólo son producidos por concentraciones fisiológicas de  $H_2O_2$ , cuando es necesario el crecimiento celular endotelial y la angiogénesis (Sellke y Simons, 1999; Bretón-Romero y Lamas, 2014).

### ***Vasodilatación dependiente de endotelio***

Los efectos de las ROS sobre el tono vascular no son uniformes ya que dependen de la ROS específica, su concentración y el lecho vascular afectado, entre otros factores (Lee y Griendling, 2008). En general, el  $\cdot O_2^-$  favorece la vasoconstricción, ya que reduce la biodisponibilidad del NO, y puede generar  $ONOO^-$  (Price et al., 2000). En contraste, el  $H_2O_2$  induce vasodilatación en diferentes lechos vasculares, como arterias mesentéricas (Gao et al., 2003), coronarias (Sato et al., 2003) o pulmonares (Burke y Wolin, 1987). La generación de  $H_2O_2$  contribuye a la regulación fisiológica del tono vascular de diferentes maneras. Se ha demostrado que actúa como EDHF (Matoba et al., 2000; Shimokawa y Morikawa, 2005) o como activador de los canales de  $K^+$  (Iida y Katusic, 2000), pero su efecto vasorrelajante ha sido estrechamente relacionado con la producción de NO. De hecho, el  $H_2O_2$  conduce a la

estimulación de la eNOS y la posterior producción de NO a través de la activación de diferentes vías de señalización como la fosfoinositol-3-quinasa/Akt quinasa (PI3K/Akt) y la ERK1/2 (Cai et al., 2003). Además, se ha descrito la implicación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la activación de la eNOS, que puede contribuir a la función protectora que ejerce el *shear stress* en el endotelio vascular: esta tensión de cizalla promueve la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que a su vez activa la p38 MAPK y la eNOS, incrementando la síntesis de NO y preservando la función endotelial (Bretón-Romero y Lamas, 2014).

### ***Crecimiento y apoptosis de células endoteliales***

El crecimiento y la apoptosis de las células endoteliales dependen de la presencia de factores de crecimiento específicos y de interacciones celulares con la matriz extracelular. *In vitro*, la privación de factores de crecimiento conduce a la apoptosis, mientras que el desprendimiento de células conduce a una forma especial de la muerte celular programada denominada anoikis (Yung et al., 2006).

La apoptosis es considerada como un mecanismo que contrarresta la proliferación celular. Diversos estímulos son capaces de desencadenar la apoptosis mediante el aumento de la producción intracelular de ROS. Por ejemplo, el  $\cdot\text{O}_2^-$  derivado de la NADPH oxidasa desempeña un doble papel en el equilibrio entre la supervivencia y la apoptosis de las células endoteliales de venas umbilicales humanas cultivadas. La LDL oxidada estimula la proliferación de estas células a concentraciones bajas pero causa apoptosis en concentraciones más altas y ambos efectos están mediados por la formación de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Por tanto, la LDL oxidada contribuye significativamente a la renovación celular vascular a través de la inducción de estrés oxidativo (Galle et al., 2001).

Por el contrario, la anoikis se define como la muerte celular programada inducida por una pérdida de las interacciones célula/matriz. La adhesión a las glicoproteínas estructurales de la matriz extracelular es necesaria para la supervivencia de las células adherentes diferenciadas en células cardiovasculares, incluyendo las células endoteliales. Este proceso está asociado con niveles de ROS intracelulares elevados, probablemente de las mitocondrias (Li et al., 1999; Yung et al., 2006).

### ***Migración de células endoteliales***

El comportamiento migratorio de las células endoteliales después de una lesión o durante la angiogénesis requiere la reorganización del citoesqueleto de actina, un proceso que parece requerir la generación de  $\cdot\text{O}_2^-$ . La producción de ROS en respuesta a una pérdida de integridad endotelial dispara la reorganización del citoesqueleto de actina necesaria para la migración y regeneración de células endoteliales (Yung et al., 2006).

### ***Activación de células endoteliales e inflamación***

La inflamación es una respuesta estereotipada de los tejidos vascularizados a la lesión y es una parte importante de la inmunidad innata que implica la respuesta inmune adaptativa. En las primeras etapas en la inflamación, hay un reclutamiento y adhesión de los leucocitos a las células endoteliales. Este proceso requiere la expresión regulada de moléculas de adhesión de la superficie celular y otras proteínas en células endoteliales (es decir, "activación" de células). Las moléculas de adhesión unen las dos células o actúan como señales que inducen la interacción entre las células endoteliales y los leucocitos incluyendo incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , la producción de ROS y el reordenamiento del citoesqueleto (Godin et al., 1993).

Las ROS producidas por neutrófilos y enzimas extracelulares también activan células endoteliales cultivadas. Las células endoteliales adyacentes a los neutrófilos pueden tener niveles elevados de  $\text{ONOO}^-$  que promueven la expresión de moléculas de adhesión. Estas células pueden representar un sitio preferencial para la adhesión y la migración de los neutrófilos. Por otra parte, los fenómenos de hipoxia e inflamación asociados a la sepsis están asociados con una alteración en la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS), incluyendo  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}\cdot$  y  $\text{NO}$  (Godin et al., 1993; Peters et al., 2003).

### ***Angiogénesis***

La angiogénesis, un proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, contribuye a la fisiopatología del cáncer, retinopatía diabética y aterosclerosis. La migración de células endoteliales es un evento esencial durante la angiogénesis, en los que las ROS pueden estar directamente involucrados. Se ha demostrado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce la proliferación y migración de células endoteliales (Kuroki et al., 1996).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se cree que la angiogénesis está regulada por varios factores de crecimiento, incluyendo el EGF y el VEGF. La inducción de estos factores angiogénicos es provocada por muchos estímulos de estrés. Por ejemplo, la hipoxia tisular ejerce una acción pro-angiogénica a través de la liberación de factores angiogénicos, de los cuales el VEGF es el más notable. Se ha demostrado que las ROS estimulan una respuesta angiogénica en corazones isquémicos reperfundidos (Arbiser et al., 2002; Maulik y Das, 2002). Una breve exposición a hipoxia/reoxigenación aumenta la producción de ROS que causa el estrés oxidativo y la angiogénesis o neovascularización. Por un lado, las ROS causan la lesión del tejido, y por otro lado promueven la reparación del tejido mediante la promoción de la angiogénesis (Yung et al., 2006).

### 1.5.2. ROS y células musculares lisas vasculares

Las células de MLV son las principales células del estroma de la pared vascular, con importantes funciones fisiológicas y estructurales. Estas células producen la matriz extracelular durante el desarrollo, que proporciona a la pared arterial la capacidad de resistir la alta presión del compartimiento sanguíneo y está implicada en la reparación arterial. Las células de MLV de los vasos de resistencia arteriales mantienen un tono contráctil variable, que es responsable de la regulación de la presión arterial y la redistribución del flujo sanguíneo (Lacolley et al., 2012).

Las ROS están implicadas en una gran variedad de funciones de las células de MLV (Yung et al., 2006). Las células de MLV responden a estímulos producidos por factores de crecimiento produciendo ROS; se ha descrito que las ROS en las células de MLV actúan como intermediarios de señalización en las vías antiapoptóticas, median el desarrollo del fenotipo proliferativo y la respuesta hipertrófica, y actúan como supresores del crecimiento e induciendo la apoptosis.

### ***Crecimiento de las células del músculo liso vascular***

Las ROS están íntimamente asociadas con el crecimiento proliferativo e hipertrófico de las células de MLV. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de inducir la fosforilación de residuos de tirosina de las MAPK, y con ello el crecimiento celular (Irani, 2000). La hipertrofia de las células de MLV inducida por Ang II es inhibida por la catalasa, lo que implica un papel activo de las ROS derivadas de la NADPH oxidasa en el crecimiento celular (Zafari et al., 1998). La proliferación

de las células de MLV desencadenada por el PDGF o la trombina también es inhibido por la catalasa, lo que implica la participación del  $H_2O_2$  (Sundaresan et al., 1995; Deshpande et al., 2002).

#### ***Diferenciación y apoptosis de las células del músculo liso vascular***

Las ROS afectan no sólo al crecimiento de las células de MLV, sino también a la apoptosis y la diferenciación. El  $H_2O_2$  puede modular el crecimiento de las células de MLV, ya sea positiva o negativamente. Concentraciones altas de  $H_2O_2$  (de 500  $\mu$ M a 1 mM) inducen la apoptosis, mientras que una concentración moderada (100  $\mu$ M) provocan la detención del ciclo celular en G1 (Deshpande et al., 2002). Las ROS endógenas inducen la maduración y diferenciación de las células de MLV a través de una vía dependiente de la p38 MAPK (Su et al., 2001). También se ha sugerido que la formación *in vivo* de radicales libres en el cerebro, como  $ONOO^-$ , está involucrada en la neurodegeneración. La exposición a  $ONOO^-$  da lugar a una elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  en las células de MLV, que activa endonucleasas dependientes de  $Ca^{2+}$  que inducen apoptosis en microvasos cerebrales (Li et al., 2003).

#### ***Migración de células del músculo liso vascular***

La migración de las células de MLV es uno de los mecanismos principales en la patogénesis de la diabetes, la aterosclerosis y la reestenosis. A pesar de que los mecanismos exactos no están claros, se ha propuesto la participación de las ROS. Se ha demostrado que la estimulación de las células de MLV con PDGF aumenta de forma transitoria los niveles intracelulares de  $H_2O_2$ , lo que sugiere que el  $H_2O_2$  actúa como una molécula de transducción de señales en la acción mediada por PDGF en las células de MLV (Sundaresan et al., 1995).

#### ***Regulación de la matriz extracelular***

Las MMP de la matriz degradan la membrana basal y la matriz extracelular, y facilitan la migración de las células de MLV. Las MMP están implicadas en el estiramiento mecánico característico de la hipertensión arterial que conduce al remodelado de la pared vascular. El estiramiento mecánico estimula la NADPH oxidasa dependiente de la formación de ROS. Por tanto, las ROS participan en el remodelado vascular a través de la activación de las MMP en la hipertensión arterial (Grote et al., 2003; Touyz y Briones, 2011).

### 1.5.3. ROS y regulación del tono vascular

El tono de los vasos arteriales está regulado por la interacción de mecanismos que promueven la vasoconstricción y la dilatación a través de complejas redes de vías de señalización interactuantes. Las ROS contribuyen a la regulación del tono vasomotor en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Uno de los mecanismos por los cuales las ROS son capaces de regular el tono vascular es a través del control del potencial redox intracelular. Las ROS derivadas de la Nox, el  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , desempeñan un papel importante como mediadores y moléculas de señalización implicadas en el control del tono vascular. El estado redox de los vasos determina la funcionalidad de los canales de  $\text{K}^+$  vasculares, así como de otras proteínas de señalización importantes para la regulación dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del tono vasomotor (Frazziano et al., 2012; Puri et al., 2013).

Los efectos de las ROS sobre el tono vascular no son uniformes debido a la diversidad de moléculas de señalización implicadas en su regulación. Además sus acciones son dependientes de la concentración y la especie de  $\text{O}_2$  reactivo, del lecho vascular, la especie y las condiciones experimentales (Taniyama y Griendling, 2003). En conjunto, el  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  parecen favorecer la vasoconstricción y atenuar la dilatación dependiente de endotelio (Katusic y Vanhoutte, 1989); sin embargo, también hay abundante evidencia en sentido opuesto (Lee y Griendling, 2008).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una molécula con efecto autocrino capaz de modificar el tono vascular de forma compleja. Mientras que los vasos de determinadas zonas se contraen en respuesta al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , otros se relajan, dependiendo de la especie, lecho vascular, y condiciones experimentales (Ardanaz y Pagano, 2006). Lucchesi y colaboradores (2005) observaron en arterias mesentéricas de resistencia de ratón que la misma concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  podía inducir tanto contracción como relajación, dependiendo de la actividad de los canales de  $\text{K}^+$ : cuando la función del canal de  $\text{K}^+$  se ve comprometida (es decir, en presencia de elevadas concentraciones extracelulares de  $\text{K}^+$ ) el  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúa como vasoconstrictor. En ese estudio, las mismas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  producen vasodilatación de los vasos precontraídos con fenilefrina (condiciones en las que la función del canal de  $\text{K}^+$  no se ve comprometida), lo que implica que el potencial de membrana de los vasos influye en el efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el tono vascular.

***Vasodilatación inducida por ROS***

La hiperpolarización de las células de MLV es un mecanismo importante para la vasodilatación, que es producida principalmente por la apertura de canales de  $K^+$ . Las células de MLV expresan varios tipos de canales de  $K^+$ , incluyendo  $K_{Ca}$ , canales de  $K^+$  ATP-sensibles ( $K_{ATP}$ ) y canales de  $K^+$  voltaje dependientes ( $K_v$ ) (Thorneloe y Nelson, 2005). La activación del  $K_{Ca}$  es un mecanismo de retroalimentación negativa que limita la vasoconstricción inducida por  $Ca^{2+}$  y media la respuesta al EDHF. El  $K_{ATP}$  limita la despolarización miogénica y controla la reactividad miogénica (Teramoto, 2006), y el  $K_v$  contribuye a inhibir el tono vasomotor y a la vasodilatación mediada por AMPc (Gutterman et al., 2005).

Los canales de  $K^+$  tienen una sensibilidad diferencial al estrés oxidativo, dependiendo de la especie oxidante y tipo de canal. El  $\cdot O_2^-$  inhibe la apertura de  $K_{ATP}$  y  $K_v$ , y el  $ONOO^-$  reduce la actividad del  $K_{Ca}$  y  $K_v$  (Gutterman et al., 2005). En contraste, el  $H_2O_2$  actúa principalmente sobre el  $K_{Ca}$  ya sea para inducir su inhibición o activación (Barlow et al., 2000; Iida y Katusic, 2000; Soto et al., 2000; Thengchaisri y Kuo, 2003). Debido a su capacidad para activar canales de  $K^+$ , se ha propuesto al  $H_2O_2$  como EDHF (Matoba et al., 2003; Yada et al., 2003; Shimokawa y Morikawa, 2005; Lee y Griendling, 2008).

El  $H_2O_2$  provoca relajación en una gran variedad de vasos, incluyendo arterias mesentéricas de humano, ratón, rata y conejo, arteria coronaria porcina, arteriolas coronarias humanas y porcinas, arterias cerebrales caninas, o arterias pulmonares de bovino y de conejo, entre otros; y la respuesta dilatadora incluye mecanismos tanto dependientes (mediados por la ruta del NO/GMPc) como independientes de endotelio (mediado por la activación de la GC y la acumulación de GMPc) (Burke y Wolin, 1987; Barlow y White, 1998; Sato et al., 2003; Lucchesi et al., 2005).

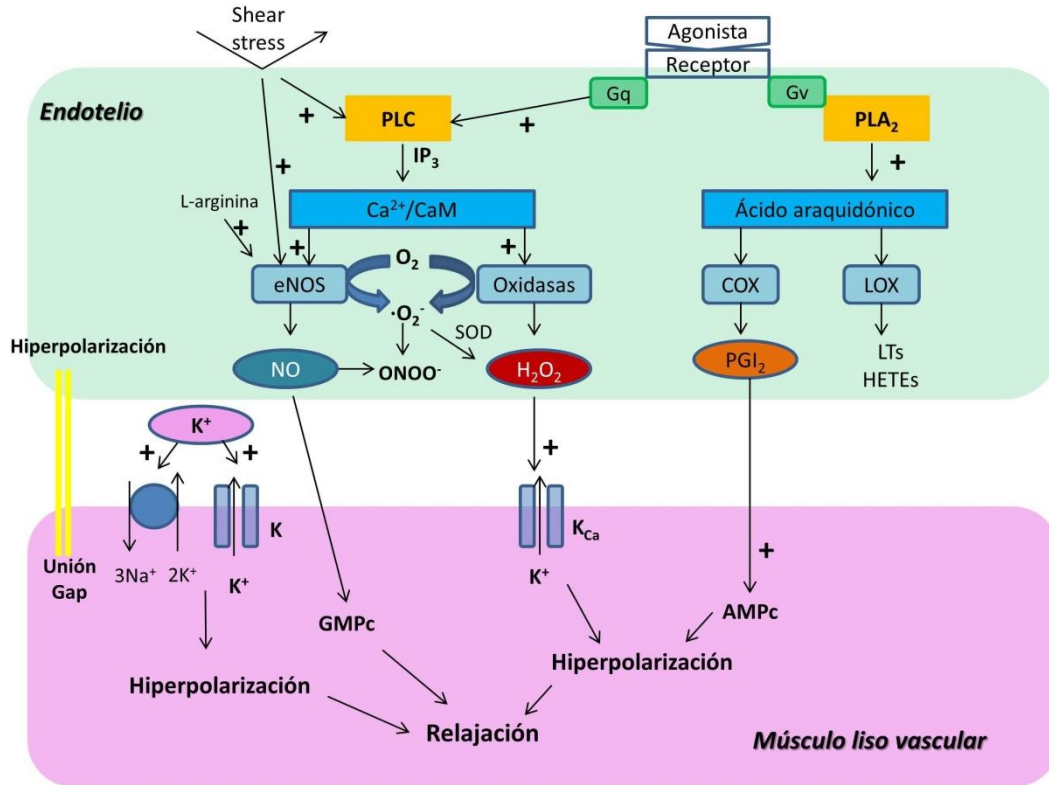
Esta vasodilatación producida por el  $H_2O_2$  está mediada a través de varios mecanismos, incluyendo la producción de GMPc en arterias pulmonares bovinas (Burke y Wolin, 1987), estimulación de la COX y producción de AMPc en arterias cerebrales caninas (Iida y Katusic, 2000), y la fosfolipasa  $A_2$  en microvasos coronarios porcinos (Barlow et al., 2000). El  $H_2O_2$  exógeno también causa vasodilatación mediante la apertura de varios tipos de canales de  $K^+$ , incluidos los  $K_{ATP}$  en arterias cerebrales de gato (Wei et al., 1996) y arterias mesentéricas de conejo (Hattori et al., 2003), y  $K_{Ca}$  en arterias cerebrales de rata (Sobey et al., 1997). El  $H_2O_2$  también puede inducir la vasodilatación dependiente del endotelio mediante la liberación

mediada por la COX-1 de PGE<sub>2</sub> y relajar el músculo liso directamente por hiperpolarización a través de la activación de K<sub>v</sub> (Gao et al., 2003) y K<sub>Ca</sub> (Shimokawa, 2010).

Las células endoteliales pueden regular el tono del músculo liso vascular adyacente. Robert Furchgott demostró por primera vez que la relajación de los vasos sanguíneos inducida por acetilcolina requiere la presencia de células endoteliales (Furchgott y Zawadzki, 1980), mientras que Rubanyi y colaboradores (1985) observaron que este proceso está mediado por la liberación de una sustancia vasoactiva, denominado factor relajante derivado del endotelio (EDRF). El EDRF se difunde a las células de MLV e induce la producción de GMPc mediante la estimulación de la GC soluble (Ignarro et al., 1986). El GMPc activa la PKG, produciendo una disminución en la concentración citosólica de Ca<sup>2+</sup>, lo que a su vez suprime la actividad de la quinasa de cadenas ligeras de miosina (MLCK), resultando en un aumento de los niveles de cadenas ligeras de miosina (MLC) desfosforiladas y relajación de las células musculares lisas (Morgado et al., 2012). La PKG también produce la activación de la fosfatasa de MLC, induciendo la vasodilatación mediante el aumento de los niveles de MLC desfosforiladas. El EDRF, que es degradado rápidamente por el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, fue identificado como NO (Palmer et al., 1987), y es sintetizado por la NOS, principalmente por la eNOS en el sistema vascular (Förstermann y Münzel, 2006; Madamanchi y Runge, 2013).

Se ha demostrado que además de la acetilcolina, numerosas sustancias vasoactivas dependen de la existencia del endotelio intacto para la inducción de vasodilatación (Vanhoutte et al., 2009). La vasodilatación dependiente del endotelio se ha atribuido a la liberación de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y NO, conocidos como EDRF (Bryan et al., 2009). La vasodilatación residual después del bloqueo farmacológico de la COX y la NOS está asociada con la hiperpolarización del músculo liso vascular y la sensibilidad al bloqueo de los canales K<sub>Ca</sub>. Esta vasodilatación dependiente del endotelio se ha atribuido a algún EDHF (Feletou y Vanhoutte, 2009). En general, la vasodilatación inducida por EDHF es más prevalente en los segmentos arteriales distales que en los proximales (Sandow y Hill, 2000). La naturaleza del EDHF no ha sido completamente aclarada, y podrían ser diferentes sustancias dependiendo de la especie, los vasos sanguíneos y el tamaño de dichos vasos (Shimokawa y Morikawa, 2005; Vanhoutte et al., 2009; Shimokawa, 2010). Se han propuesto diversos candidatos a EDHF, incluyendo los ácidos epoxieicosatrienoicos derivados del citocromo P450 epoxigenasa (Campbell y Falck, 2007), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial o derivado de oxidasas (Matoba et al., 2000; Shimokawa, 2010), iones K<sup>+</sup> (Edwards et al., 1998) y/o canales de acoplamiento eléctrico directo a través de uniones gap

mioendoteliales (Griffith et al., 2004; Feletou y Vanhoutte, 2009; Dora et al., 2010; Kvietys y Granger, 2012).



**Figura IX. Hipótesis de la naturaleza del EDHF.** Los principales candidatos a EDHF son los ácidos epoxieicosatrienoicos derivados de la LOX, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las uniones gap mioendoteliales, o los iones K<sup>+</sup>. Adaptado de: Shimokawa, 2010.

El NO derivado del endotelio media la relajación vascular de arterias de conductancia relativamente grandes (por ejemplo, aorta y arterias coronarias epicárdicas), mientras que el EDHF desempeña un importante papel en la modulación del tono vascular en pequeñas arterias de resistencia *in vitro*. El EDHF es sintetizado no sólo bajo el estímulo de agonistas sino también por el *shear stress*, y su síntesis y liberación es estimulada por incrementos en el Ca<sup>2+</sup> intracelular en el endotelio (Shimokawa y Morikawa, 2005; Vanhoutte, 2009). El NO y las PG vasodilatadoras también producen hiperpolarización del MLV subyacente y el NO puede activar canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de gran conductancia (BK<sub>Ca</sub>) en algunos vasos sanguíneos, aunque estas respuestas vasodilatadoras al NO y PG pueden ser también abolidas mediante la inhibición de K<sub>ATP</sub> (Shimokawa, 2010).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la vía del EDRF, un aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  activa la eNOS, generando NO. El NO difunde a los miocitos donde activa la GC soluble, que cataliza la formación de GMPc (Bryan et al., 2009). El aumento de los niveles de GMPc de los miocitos inicia una cascada de señalización que induce una disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  y posterior relajación del músculo liso. La disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$  en los miocitos viene dado como resultado del flujo de salida de  $K^+$  debido a la activación de  $BK_{Ca}$ , produciendo la hiperpolarización de la membrana de los miocitos y la reducción de afluencia de  $Ca^{2+}$  (Tanaka et al., 2004; Feletou, 2009). Alternativamente, el NO puede inducir la relajación del músculo liso a través de mecanismos independientes de la GC soluble (Bryan et al., 2009). La  $PGI_2$  se une al IP, lo que resulta en la generación de AMPc, que inicia una cascada de señalización que conduce a una disminución en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular en los miocitos a través de la activación de  $BK_{Ca}$  (Tanaka et al., 2004; Feletou, 2009; Kvietys y Granger, 2012).

Con respecto a la vía del EDHF, el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  produce la activación de canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de pequeña e intermedia conductancia ( $SK_{Ca}$  y  $IK_{Ca}$ ) situados en caveolas endoteliales y proyecciones celulares (Feletou y Vanhoutte, 2009; Dora, 2010). La salida de  $K^+$  al exterior de la célula produce la hiperpolarización de las células endoteliales, que pueden propagarse a los miocitos por conducción y/o el movimiento de las moléculas de señalización a través de las uniones gap mioendoteliales. Además, la acumulación extracelular de  $K^+$  derivado del endotelio puede hiperpolarizar los miocitos adyacentes a través de la estimulación de la  $Na^+-K^+$  ATPasa y/o canales de  $K^+$  rectificadores (Feletou y Vanhoutte, 2009). Finalmente, la hiperpolarización del músculo liso vascular inducida por EDHF difusibles (por ejemplo,  $H_2O_2$ ) es el resultado de la activación de  $BK_{Ca}$  en el músculo liso vascular (Edwards et al., 2010; Kvietys y Granger, 2012).

Hay interacciones antagónicas significativas entre las ROS derivadas del endotelio y el NO. El  $\cdot O_2^-$  puede interactuar con el NO, interfiriendo con la activación de la GC soluble. Por el contrario, la interacción directa entre el  $\cdot O_2^-$  y el NO puede reducir el componente ROS de la vasodilatación dependiente del endotelio. Además, el estrés oxidativo puede conducir a la inhibición directa de la eNOS por fosforilación de la Tyr657 o el desacoplamiento de la eNOS a través de la oxidación del cofactor  $BH_4$  (Kvietys y Granger, 2012).

Aunque la relajación vascular en vasos grandes mediadas por la bioactividad del NO derivado del endotelio depende principalmente de las concentraciones de  $\cdot O_2^-$ , la relajación dependiente del endotelio en pequeños vasos de resistencia está mediada por  $H_2O_2$ . Matoba y

colaboradores (2000) demostraron de que la relajación dependiente del endotelio y la hiperpolarización de las células de MLV en pequeñas arterias mesentéricas de ratones en respuesta a la acetilcolina es inhibida por la catalasa, proponiendo por primera vez que el  $H_2O_2$  es el EDHF.

### ***Vasoconstricción inducida por ROS***

La contracción de las células de MLV se consigue principalmente a través de la fosforilación de la MLC, que está mediada por la MLCK, seguido por la activación de la ATPasa de la miosina activada por actina, provocando el entrecruzamiento de los filamentos contráctiles. Además de la MLCK, la fosforilación de la MLC está regulada por la miosina fosfatasa, que a su vez está regulada por la Rho quinasa. La activación de la Rho quinasa inactiva la miosina fosfatasa, que resulta en un incremento de la fosforilación de MLC y una contracción independiente de  $Ca^{2+}$ , que se conoce como sensibilización al  $Ca^{2+}$  (Lee y Griendling, 2008).

Las ROS participan en la vasoconstricción a través de la liberación de metabolitos del ácido araquidónico, que activan el receptor TP en las células de MLV. Estos factores se conocen como factores contráctiles derivados del endotelio (EDCF) (Vanhoutte et al., 2005). Es posible que el EDCF se produzca en las células endoteliales, siendo productos derivados del ácido araquidónico catalizados por la COX-1 (Yang et al., 2003), que producen vasoconstricción mediante la interacción con receptores TP en las células de MLV (Yung et al., 2006).

En condiciones de reposo, el  $H_2O_2$  induce contracción en la aorta, la arteria pulmonar y la arteria mesentérica superior de la rata, la arteria pulmonar porcina, y la arteria basilar canina (Rodríguez-Martínez et al., 1998; Yang et al., 1999; Pelaez et al., 2000a; Pelaez et al., 2000b; Gao y Lee, 2001). La vasoconstricción inducida por  $H_2O_2$  está mediada por la tirosina quinasa, los productos de la COX, la PKC, las MAPK y la Rho quinasa (Jin y Rhoades, 1997; Rodríguez-Martínez et al., 1998; Yang et al., 1999; Gao y Lee, 2001; Thakali et al., 2005). Las ROS son capaces de activar la Rho quinasa y se ha implicado directamente a esta enzima en el efecto constrictor del  $H_2O_2$  en las venas (Thakali et al., 2005). Además, se ha demostrado que el  $H_2O_2$  produce vasoconstricción vía MAPK, incluyendo la ERK1/2 (Oeckler et al., 2005) y la p38 (Lucchesi et al., 2005). Tanto la activación de la MLCK como la inactivación de la miosina fosfatasa puede ser inducida por las ERK1/2 y p38 MAPK, lo que produce un aumento en la fosforilación de la MLC (Lee y Griendling, 2008). A su vez, la ERK1/2 modula la MLCK mediante

el aumento de MLC 20 fosforilada. Además, la ERK1/2 es capaz de fosforilar caldesmón, una proteína de unión a actina que, una vez fosforilada, inhibe la interacción actina-miosina y por lo tanto la contracción (Ardanaz y Pagano, 2006).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otras ROS son capaces de regular de forma directa la contracción del músculo liso a través de mecanismos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Horowitz et al., 1996). Tanto el  $\cdot\text{O}_2^-$  como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje (VOC) tipo L (Tabet et al., 2004). Asimismo, el  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS a través de la activación del receptor de rianodina (RyR) o el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (IP3R) (Grover y Samson, 1988; Suzuki y Ford, 1992; Favero et al., 1995). Además, se ha demostrado un efecto inhibitorio de las ROS en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) (Grover et al., 1992; Zaidi y Michaelis, 1999) y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo endoplásmico- sarcoplásmico (SERCA) (Grover et al., 2003; Lee y Griendling, 2008). Algunas de estas vías se han descrito como vías de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ , definidas como incrementos en la fuerza generada sin aumentos en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Somlyo y Somlyo, 2003).

Sotnikova y colaboradores (1998) y Lucchesi y colaboradores (2005) demostraron que el aumento de  $\text{K}^+$  extracelular aumenta el efecto vasoconstrictor del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El  $\text{K}^+$  extracelular evoca dos efectos posibles que contribuyen a la vasoconstricción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ : por un lado, el bloqueo de los canales de  $\text{K}^+$  inducido por altos niveles de  $\text{K}^+$  extracelular revela un efecto contráctil del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la supresión de la vasodilatación mediada por canales de  $\text{K}^+$  inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gao et al., 2003). Por otro lado, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  activa vías de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ , incrementando la contracción dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  secundaria a la despolarización (Amberg et al., 2003; Ardanaz y Pagano, 2006).

Además de mediar la vasodilatación a través de EDRF y EDHF, el endotelio puede mediar la vasoconstricción a través de la liberación de factores que provocan la contracción del músculo liso que le rodea. Los principales candidatos a EDCF son prostanoideos derivados de la COX como el  $\text{TXA}_2$ , la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y la  $\text{PGI}_2$  (Félétou et al., 2009; Feletou et al., 2010). La  $\text{PGI}_2$  se considera un EDRF que induce la relajación del músculo liso mediante la activación de los IP en los miocitos. La vasoconstricción mediada por  $\text{PGI}_2$  es el resultado de la unión de la  $\text{PGI}_2$  a los TP, que inducen la contracción del músculo liso a través de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (Félétou et al., 2009) o inhibición de la vía vasodilatadora del  $\text{GMPC}/\text{AMPC}$  (Liu et al., 2010; Kvietys y Granger, 2012).

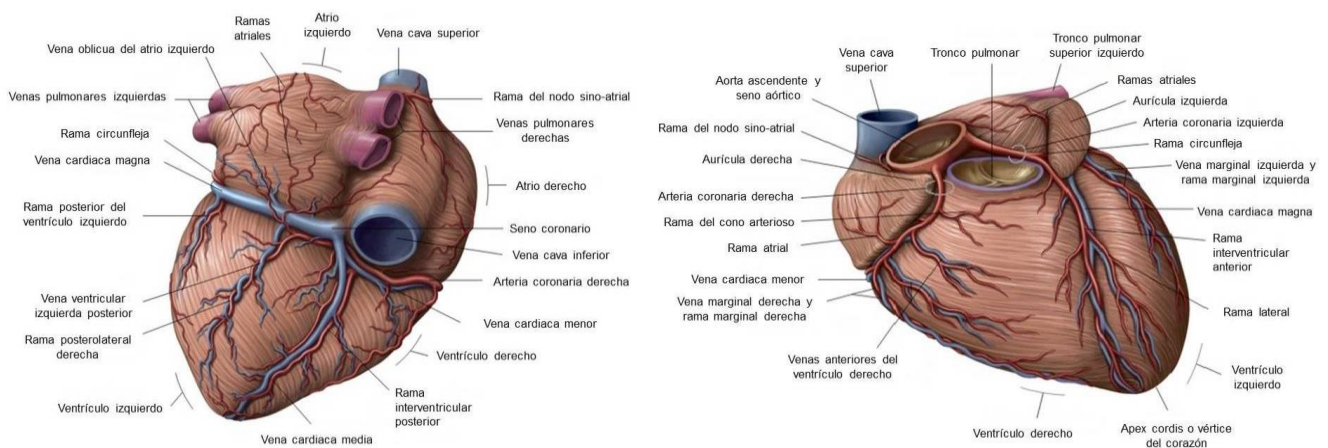
1.5.4. ROS y circulación coronaria

El circuito coronario humano se compone de dos compartimentos, uno de conductancia constituido por las arterias coronaria epicárdicas y uno de resistencia representado por las arteriolas y vasos de hasta 400  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los vasos de resistencia son responsables de la capacidad del corazón de regular su propio aporte sanguíneo de acuerdo a sus necesidades metabólicas. El corazón es capaz de mantener un flujo sanguíneo constante a pesar de los cambios de la presión aórtica. La existencia de dicha autorregulación obedece a la alta dependencia de la función cardíaca respecto al aporte sanguíneo coronario, debido a los altos requerimientos aeróbicos (Barrera-Ramírez y Escaned, 2005).

Las arterias coronarias principales se apoyan en la superficie del corazón y las más pequeñas penetran desde la superficie en la masa muscular cardíaca. Es a través de esas arterias que casi todo el corazón recibe su aporte de nutrición sanguínea. Solo la décima parte del milímetro interno de la superficie endocárdica puede obtener una nutrición significativa directamente de la sangre que recorre el interior de las cámaras cardíacas. La *arteria coronaria izquierda* nutre principalmente las porciones anterior e izquierda de las porciones laterales del ventrículo izquierdo, mientras que la *arteria coronaria derecha* nutre principalmente la mayor parte del ventrículo derecho y también la parte posterior del ventrículo izquierdo. La mayoría del flujo sanguíneo venoso coronario del músculo ventricular izquierdo vuelve hacia la aurícula derecha del corazón a través del *seno coronario*, que supone aproximadamente el 75% del flujo sanguíneo coronario total. Y la mayoría de la sangre venosa coronaria del músculo ventricular derecho vuelve a través de pequeñas venas cardíacas anteriores que fluyen directamente en la aurícula derecha y no a través del seno coronario. Una cantidad muy pequeña de la sangre venosa coronaria también vuelve hacia el corazón a través de las mínimas *venas de Tebesio*, que vacían directamente en todas las cámaras del corazón (Guyton y Hall, 2011).

El consumo miocárdico de  $\text{O}_2$  en reposo varía entre 8 y 10 ml/min por cada 100 g de músculo cardíaco (12% del consumo de  $\text{O}_2$  corporal) frente a un consumo de  $\text{O}_2$  del músculo estriado de 0.5 ml/min. La relación entre flujo coronario y demanda metabólica es casi lineal. El flujo coronario basal en el hombre adulto en reposo es cercano a los 60 - 65 ml/min por cada 100 g de tejido, aproximadamente un 5-8% del gasto cardíaco (Barrera-Ramírez y Escaned, 2005).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



**Figura X. Vascularización cardíaca.** Visión anterior (arriba) y posteroinferior (abajo) de la irrigación del órgano cardíaco. La irrigación del corazón depende de las dos arterias coronarias, derecha e izquierda. Los vasos de mayor calibre discurren por la superficie cardíaca, penetrando en las fibras miocárdicas las ramas de pequeño calibre.

El flujo sanguíneo que atraviesa el sistema coronario está regulado principalmente por la vasodilatación arteriolar local en respuesta a las necesidades nutricionales del músculo cardíaco. Es decir, siempre que aumente la fuerza de la contracción cardíaca, la velocidad del flujo sanguíneo coronario también lo hace. El flujo sanguíneo en las arterias coronarias está regulado casi exactamente en proporción a las necesidades de  $O_2$  de la musculatura cardíaca. Normalmente, casi el 70% del  $O_2$  en la sangre arterial coronaria es extraído a medida que el flujo sanguíneo atraviesa el músculo cardíaco. Por ello, el flujo sanguíneo aumenta casi en proporción directa a cualquier consumo metabólico adicional de  $O_2$  en el corazón (Guyton y Hall, 2011). Bajo condiciones de alta demanda miocárdica, el flujo coronario basal puede incrementarse de 5 a 6 veces (Barrera-Ramírez y Escaned, 2005).

El flujo coronario está modulado no sólo por el tono arteriolar, sino de forma fásica por las variaciones en la compresión extravascular registradas a lo largo del ciclo cardíaco. Durante la sístole y la diástole, se producen cambios sucesivos del flujo sanguíneo coronario por efecto de la compresión del músculo cardíaco. El flujo sanguíneo de los capilares coronarios del músculo ventricular izquierdo desciende hasta un valor bajo durante la sístole, que es lo contrario de lo que sucede con el flujo en los lechos vasculares de cualquier otra zona del organismo. Durante la diástole el músculo cardíaco se relaja y ya no obstruye el flujo sanguíneo a través de los capilares musculares del ventrículo izquierdo, de forma que la sangre fluye rápidamente durante toda la diástole. El flujo sanguíneo que atraviesa los

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

capilares coronarios del ventrículo derecho también sufre cambios fásicos durante el ciclo cardiaco, pero como la fuerza de contracción del músculo ventricular derecho es mucho menor que la del músculo ventricular izquierdo, los cambios fásicos inversos sólo son parciales, al contrario de lo que sucede en el músculo ventricular izquierdo (Barrera-Ramírez y Escaned, 2005; Guyton y Hall, 2011).

Las ROS, a concentraciones fisiológicas, regulan diversas vías de señalización que subyacen la función cardiovascular. El  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son las moléculas más comúnmente implicadas en los eventos fisiológicos y fisiopatológicos (Cai, 2005). En diversas condiciones fisiopatológicas, incluyendo isquemia-reperfusión, inflamación, hipertensión, diabetes y aterosclerosis, se han detectado niveles elevados de  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Todas estas condiciones se han asociado con disfunción endotelial y con reducción de la biodisponibilidad de NO.

Se ha descrito que en modelos animales de hipertensión e hipertrofia miocárdica, la liberación excesiva de ROS está asociada con la activación del sistema renina-angiotensina (Xu et al., 2010). Sin embargo, la acción vasomotora de la Ang II en la circulación coronaria es controvertida, ya que puede aumentar o reducir el flujo sanguíneo coronario (Heyndrickx et al., 1976; Pörsti et al., 1993). Tampoco está claro si la Ang II puede modular el tono vascular mediante la generación de ROS, ya que se ha descrito que la Ang II puede inducir una mayor producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Sohn et al., 2000). El pretratamiento de arteriolas coronarias aisladas con una concentración subumbral de Ang II (0,1 nmol/L) durante 60 minutos provocó una elevación en la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  en la pared vascular, inhibiendo la producción de NO y la dilatación mediada por NO dependiente del endotelio en respuesta a adenosina, un potente vasodilatador en el corazón. Este efecto inhibitor de la Ang II fue bloqueado por el losartán, bloqueante del receptor tipo 1 de Ang II; el scavenger de  $\cdot\text{O}_2^-$ , tempol; o el inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina (Zhang et al., 2003). Estos hallazgos indican que la Ang II, a niveles que no producen actividad vasomotora, ejerce un efecto adverso sobre la función vasodilatadora mediada por NO dependiente del endotelio, a través de la liberación de  $\cdot\text{O}_2^-$  por medio de la activación mediada por el receptor AT1 de la vía de la NADPH oxidasa.

La proteína C reactiva (PCR), marcador inflamatorio que se ha establecido como un factor de riesgo cardiovascular, también presenta efectos adversos sobre la función vasodilatadora mediada por NO dependiente del endotelio y la producción de NO en arteriolas coronarias (Qamirani et al., 2005), mediante el incremento de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  mediada por la NADPH oxidasa en la pared vascular a través de la activación de la p38 MAPK. La PCR

también afecta a las vías endoteliales del ácido araquidónico (Hein et al., 2009). La formación de  $\text{ONOO}^-$  a partir de NO (liberación basal) y  $\cdot\text{O}_2^-$  (liberación estimulada por la PCR) en el endotelio parece comprometer la producción de la  $\text{PGI}_2$ , y por lo tanto la vasodilatación mediada por  $\text{PGI}_2$ , mediante la inhibición de la actividad de la  $\text{PGI}_2$  sintasa.

El factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) es una citoquina proinflamatoria y un mediador importante de complicaciones cardiovasculares tales como infarto agudo de miocardio, lesión por isquemia-reperfusión, aterosclerosis o insuficiencia cardíaca crónica. El tratamiento de arteriolas coronarias aisladas con una concentración patológica de TNF- $\alpha$  (1 ng/ml, 90 minutos) causó una reducción significativa de la liberación de NO, incremento en la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  y fosforilación de JNK en células endoteliales arteriolas (Zhang et al., 2006). El estrés oxidativo inducido por el TNF- $\alpha$  y la disfunción endotelial están asociados con la activación de JNK y la posterior producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  a través de la XO.

Diversos tipos de células, incluyendo las células vasculares, pueden liberar  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que se ha descrito como un EDHF (Matoba et al., 2003). Esta respuesta vasodilatadora parece participar en la homeostasis coronaria mediante el mantenimiento de la perfusión durante la reducción de presión (es decir, la autorregulación) (Yada et al., 2003) y la activación metabólica (Saitoh et al., 2007), respectivamente, en el corazón. Curiosamente, en estados de enfermedad, la acción vasodilatadora del  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece compensar la alteración de la dilatación mediada por NO asociada al desacoplamiento de la eNOS (Katusic, 2001).

La señalización redox a concentraciones fisiológicas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberado de los cardiomiocitos y/o células endoteliales desempeña un papel indispensable en el mantenimiento de la homeostasis de la microcirculación, mediante la regulación de la actividad vasomotora. La liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  del sistema vascular ayuda a restaurar la función vasomotora mediante la compensación del déficit de NO en microvasos coronarios colaterales adaptados a la isquemia miocárdica crónica con la práctica de ejercicio. La producción excesiva y prolongada de  $\cdot\text{O}_2^-$ , vía NADPH oxidasa o XO, y la subsiguiente formación excesiva de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , parecen generar estrés oxidativo e inflamación, que sobrepasa los beneficios que produce su acción vasoreguladora por perjudicar la función endotelial y agotar la reserva vasodilatadora (Kuo et al., 2012).

Las arterias coronarias son las encargadas de proporcionar el  $\text{O}_2$  y los nutrientes necesarios al corazón. Cualquier obstrucción en este flujo puede inducir desórdenes cardiacos y por tanto, el tono coronario está estrechamente regulado. La concentración citosólica de

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

$\text{Ca}^{2+}$  es clave en la regulación de dicho tono, y cualquier alteración en el transporte de este catión puede afectar al correcto funcionamiento del músculo liso o las células endoteliales. En estado de reposo la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es de 0,1  $\mu\text{M}$ , pero la concentración extracelular es de aproximadamente 1 mM y los niveles en el RS son aún mayores (Walia et al., 2003). Los principales mecanismos de regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  incluyen los canales VOC, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), las bombas SERCA y PMCA, y los mecanismos para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS. Todos ellos serán desarrollados en el apartado 2 de esta revisión.

Las ROS tienen la capacidad de dañar directamente las células vasculares y los miocitos cardíacos. En el músculo cardíaco, las ROS pueden disminuir la producción de ATP y por tanto disminuir la capacidad de funcionamiento de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , produciendo de este modo una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Kaneko et al., 1994). Esta sobrecarga puede producir alteraciones contráctiles. Las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  se pueden clasificar en PMCA y SERCA. Las SERCA están codificadas por tres genes diferentes. El músculo liso de la arteria coronaria expresa el gen SERCA2, predominantemente la variante SERCA2b (Misquitta et al., 1999).

En general, las bombas SERCA son más susceptibles a las ROS que las PMCA (Grover et al., 1992; Grover et al., 2003). Esta resistencia es importante ya que influye en la supervivencia de las células, ya que una excesiva concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  podría causar la muerte celular. El daño inducido por las ROS a la SERCA del músculo liso en arterias coronarias conduce a una disminución en el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  y resulta en un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{ONOO}^-$  son capaces de inactivar la SERCA en membranas aisladas de arterias coronarias (Grover et al., 1992; Grover et al., 2003). La inactivación de la SERCA produce una disminución en la flexibilidad del músculo liso arterial, mostrando una disminución en la contracción inducida por Ang II y en cierta medida por las endotelinas (Grover et al., 1995).

El endotelio de la arteria coronaria expresa el gen SERCA3 además del SERCA2 expresado por el músculo liso. En células HEK293, que sobreexpresan las proteínas de la SERCA, la resistencia a la inactivación por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\cdot\text{O}_2^-$  es mayor para la proteína SERCA3 que para SERCA2 (Grover et al., 1997). En cultivos de células de arteria coronaria tratados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la resistencia al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células endoteliales, comparado con células musculares lisas, es incluso mayor de lo esperado para tejidos que expresan diferentes isoformas de la SERCA (Grover y Samson, 1997). Esta diferencia también se refleja cuando se examinan los efectos del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la contractilidad de la arteria. El ácido ciclopiazónico (CPA), inhibidor de la SERCA, produce contracción en arterias sin endotelio, pero relaja las arterias precontraídas con

endotelio intacto. El tratamiento con  $H_2O_2$  inhibe la contracción en arterias sin endotelio, pero la relajación dependiente de endotelio es relativamente resistente a este tratamiento. Además, el CPA produce un aumento transitorio del  $Ca^{2+}$  intracelular en células cultivadas. En células del músculo liso este aumento es inhibido por el tratamiento de las células con  $H_2O_2$ , pero las células endoteliales son resistentes a este tratamiento (Grover y Samson, 1997). Estas diferencias surgen en parte de una muy alta actividad específica de la catalasa presente en el endotelio en comparación con el músculo liso (Grover et al., 2000), lo que sugiere que el endotelio tiene un papel protector del músculo liso subyacente (Walia et al., 2003).

### **1.6. Estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular**

El estrés oxidativo está implicado en diversas condiciones patológicas entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares, cáncer, trastornos neurológicos, diabetes, isquemia/reperfusión y envejecimiento (Dalle-Donne et al., 2006). Estas enfermedades se clasifican en dos grupos. El primer grupo incluye enfermedades caracterizadas por la presencia de pro-oxidantes que producen cambios en el estado redox y que alteran la tolerancia a la glucosa -los denominados estados de estrés oxidativo mitocondrial- (cáncer y diabetes mellitus); y el segundo grupo que incluye enfermedades caracterizadas por condiciones oxidantes inflamatorias y aumento de la actividad de la NADPH oxidasa (que conduce a aterosclerosis y a inflamación crónica) o la formación de ROS inducida por la XO (implicada en la isquemia y lesión por reperfusión) (Valko et al., 2007).

El estrés oxidativo inducido por ROS en miocitos cardiacos y vasculares se ha relacionado con lesiones del tejido cardiovascular y participa en la génesis de diversas enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis, enfermedad isquémica cardiaca, hipertensión, cardiomiopatías, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca congestiva. Las principales fuentes de estrés oxidativo en el sistema cardiovascular incluyen la XO, la NADPH oxidasa, la NOS y los citocromos mitocondriales (Berry y Hare, 2004; Hare y Stamler, 2005). La NOS también es una fuente importante de RNS, incluyendo el NO, que produce modificaciones de grupos tiol de residuos de cisteína en aminoácidos, péptidos y proteínas.

El estrés oxidativo se asocia con aumento de la formación de ROS, que modifican los fosfolípidos y proteínas conduciendo a la peroxidación y la oxidación de los grupos tiol. Estas modificaciones conducen a cambios en la permeabilidad de la membrana y a la modificación

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

funcional de diversas proteínas celulares (Molavi y Mehta, 2004). También se producen alteraciones en la función de los miocitos debido al aumento de estrés oxidativo asociado a los efectos de ROS en organelas subcelulares.

El papel crítico de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la génesis de la disfunción del miocito ha sido bien establecido (Pérez et al., 1998). En general, la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser inducida por efecto directo de ROS sobre las proteínas involucradas en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular o indirectamente, mediante la inducción de la peroxidación lipídica de la membrana. Además, también deben ser considerados otros mecanismos que implican un aumento en la concentración de  $\text{Na}^+$  y la acumulación de ácidos grasos de cadena larga. El déficit de ATP también puede afectar a los mecanismos de control de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sarcolema y así inducir la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . La sobrecarga intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser un denominador común para la estimulación de la hiperplasia de la neoíntima y por lo tanto la aparición de aterosclerosis, la vasoconstricción en el desarrollo de hipertensión, el daño celular miocárdico observado en isquemia-reperfusión y la hipertrofia cardiaca en la insuficiencia cardiaca (Valko et al., 2007).

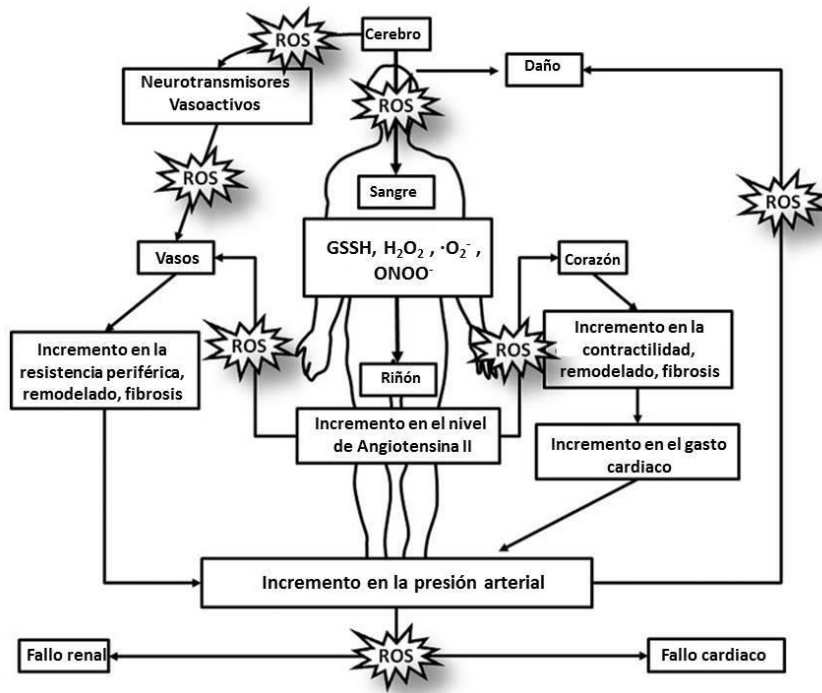
En condiciones patológicas, la función endotelial se ve descompensada, de tal forma que los mecanismos de protección se ven sobrepasados por procesos perjudiciales que conducen al deterioro de la vasodilatación dependiente de endotelio, el aumento de la reactividad vascular, la activación plaquetaria, el aumento de la permeabilidad, la adhesión leucocitaria y la migración de monocitos en la pared vascular (Endemann y Schiffrin, 2004). Los mecanismos moleculares que contribuyen al deterioro de las células endoteliales son el incremento en la expresión de moléculas de adhesión, el aumento de la síntesis de factores pro-inflamatorios y pro-ateroscleróticos, la activación del sistema renina-angiotensina local y aumento de la secreción de ET-1 (Cai y Harrison, 2000; Endemann y Schiffrin, 2004). El aumento de la biodisponibilidad de ROS y la desregulación de la señalización redox, junto con la disminución de la producción de NO por reducción de la actividad de la eNOS y el aumento de consumo de NO por las ROS contribuyen a muchos de los eventos moleculares subyacentes a la lesión endotelial (Cai y Harrison, 2000; Giles, 2006). La disfunción endotelial es una característica de diversas enfermedades vasculares como la hipertensión, la diabetes, la aterosclerosis, la hipertensión pulmonar, la enfermedad isquémica cardiaca o la enfermedad renal crónica (Montezano y Touyz, 2012).

1.6.1. Estrés oxidativo e hipertensión

La hipertensión se define como una elevación crónica de la presión arterial que es determinada por el gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica total. En la etapa inicial de ciertas formas de hipertensión, es predominante un aumento en el gasto cardíaco. En la fase establecida de hipertensión, sin embargo, el gasto cardíaco se encuentra dentro de valores normales y la resistencia periférica se encuentra elevada. Una causa importante del incremento en la resistencia periférica es la alteración de la reactividad vascular (es decir, una mayor rigidez y disminución de la distensibilidad). La desregulación de la función vasomotora y remodelado estructural de los vasos sanguíneos son los principales contribuyentes a esta función vascular alterada (Lee y Griendling, 2008; Touyz y Briones, 2011).

El remodelado vascular y el aumento de la resistencia vascular periférica son características comunes de la hipertensión esencial. Las arterias de resistencia juegan un papel importante en su desarrollo y pueden contribuir a las complicaciones de la hipertensión (Savoia et al., 2011). Una pequeña disminución en el lumen de las arterias pequeñas aumenta significativamente la resistencia al flujo sanguíneo. El endotelio participa en la regulación del tono vascular, lo que puede afectar a la función y al remodelado vascular. La disfunción endotelial se caracteriza por una alteración en la respuesta vasomotora (vasodilatación reducida y aumento de la contracción dependiente de endotelio) y por un fenotipo proinflamatorio y protrombótico (Vanhoutte et al., 2009).

La disfunción endotelial vascular promueve la inflamación mediante la inducción de la producción de agentes vasoconstrictores, moléculas de adhesión y factores de crecimiento, incluyendo la Ang II y la ET-1 (Durier et al., 2003; Yu et al., 2008). La Ang II está activamente involucrada en la fisiopatología de la hipertensión, pudiendo producir disfunción endotelial e inflamación vascular mediante la inducción de estrés oxidativo, que resulta en la regulación positiva de mediadores inflamatorios (Savoia et al., 2011; Touyz y Briones, 2011).



**Figura XI. Implicaciones del estrés oxidativo en la hipertensión.** Los niveles patológicos de ROS producen una serie de efectos deletéreos. En el cerebro, las ROS incrementan la producción de neurotransmisores que afectan al tono vascular. En el riñón, las ROS incrementan la producción de agentes vasoconstrictores como la Ang II. Las ROS influyen en procesos implicados en el remodelado, la fibrosis, la inflamación y la disfunción endotelial, característicos de la hipertensión. En el corazón, las ROS están asociadas con aumento de la contractilidad, fibrosis y remodelado. Adaptado de: Montezano y Touyz, 2014.

La hipertensión se asocia con cambios en la reactividad vascular. En concreto, la vasoconstricción en respuesta a agonistas como serotonina, fenilefrina y  $H_2O_2$  se ve incrementada (Gao y Lee, 2001; Watts, 2002; Lee et al., 2004; Touyz y Briones, 2011), mientras que la relajación dependiente del endotelio se reduce. Cambios en el potencial de membrana del MLV y en el manejo del  $Ca^{2+}$  se han propuesto para explicar la mayor vasoconstricción en la hipertensión y la disfunción endotelial responsable de la reducción de la relajación dependiente del endotelio (Cox et al., 2003). Además del aumento de la resistencia arterial, en la hipertensión es importante el aumento del tono venoso, debido a que la presión media de llenado circulatorio, un índice del tono venomotor, está incrementado en la hipertensión (Thakali et al., 2006).

La etiología del estrés oxidativo inducido por ROS en la patogénesis de la hipertensión está bien establecida; en pacientes hipertensos se han descrito cantidades incrementadas de  $H_2O_2$  y  $\cdot O_2^-$  (Romero y Reckelhoff, 1999). El  $\cdot O_2^-$  promueve la proliferación celular, mientras que el  $H_2O_2$  induce la apoptosis y activa la PKC, lo que sugiere que esta proteína participa en la enfermedad vascular mediada por ROS.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El estrés oxidativo inducido por ROS en pacientes hipertensos se acompaña de disminución de los niveles de antioxidantes como la vitamina E, GSH y SOD. La interacción del  $\cdot\text{O}_2^-$  y NO (que conduce a la formación de ONOO $^-$ ) también parece estar implicado en el desarrollo de hipertensión (Li y Föstermann, 2000). Dado que las células endoteliales vasculares son capaces de generar NO, la supresión de la formación de NO que acompaña la disfunción endotelial es un factor importante en el desarrollo de hipertensión (Valko et al., 2007).

La Ang II se considera una hormona multifuncional capaz de influir en muchos procesos celulares que implican la regulación de la función vascular, incluyendo el crecimiento celular, la apoptosis, la migración, la inflamación y la fibrosis (Romero y Reckelhoff, 1999). Esta hormona juega un papel clave en la regulación de la presión sanguínea y la homeostasis de fluidos, y la producción de ROS está estrechamente vinculada con la acción de la Ang II (Lee y Griending, 2008). Se sabe que todos los tipos de células vasculares, incluyendo células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos y macrófagos generan  $\cdot\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de especial interés como especies de señalización inter- e intracelulares. Los vínculos entre el estrés oxidativo y la hipertensión se han establecido con la demostración de que la Ang II aumenta la formación de ROS en las células de MLV. Además, la hipertensión inducida por Ang II se ha asociado con un aumento de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  vascular (Laursen et al., 1997; Valko et al., 2007; Touyz y Briones, 2011; Montezano y Touyz, 2014).

El desacoplamiento de la eNOS contribuye al aumento de la producción de ROS y la disfunción endotelial observados en diversas enfermedades vasculares (Moens y Kass, 2006), incluyendo la hipertensión (Roe y Ren, 2012; Majzunova et al., 2013). Este desacoplamiento, que desplaza el equilibrio nitroso-redox con consecuencias adversas, se ha demostrado en modelos experimentales de hipertensión y está implicado en la aterosclerosis y la disfunción endotelial (Ketonen y Mervaala, 2008; Moens et al., 2008). La reducción de la biodisponibilidad de la  $\text{BH}_4$ , con el consiguiente desacoplamiento de la NOS, y el estrés oxidativo, se han implicado en pacientes con diabetes, enfermedad arterial coronaria, insuficiencia cardíaca y lesión por isquemia-reperfusión (Montezano y Touyz, 2012).

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es otra fuente importante de generación de ROS. Cualquier daño en los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial conduce a la disfunción de la respiración mitocondrial, con la consiguiente transferencia de electrones al  $\text{O}_2$  molecular incrementando la producción mitocondrial de  $\cdot\text{O}_2^-$

y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Radi et al., 2002). Además, el aumento de la formación de  $\text{ONOO}^-$  mitocondrial conduce a la nitración y la inactivación de la MnSOD (MacMillan-Crow et al., 1998), exacerbando aún más la producción de ROS. Finalmente, las ROS citosólicas, a través de la apertura de los  $\text{K}_{\text{ATP}}$  mitocondriales dependientes del estado redox (Andruekhiv et al., 2006) y los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (Brandes, 2005), estimulan la formación mitocondrial de ROS.

En células de MLV y células endoteliales, la NADPH oxidasa actúa como la fuente primaria de ROS y es particularmente importante en la fisiopatología de la hipertensión (Touyz et al., 2011). En el sistema vascular, la producción de ROS a través de la NADPH oxidasa se activa por la estimulación de agentes vasoconstrictores neurohumorales, como la Ang II, la ET-1 y la noradrenalina. La Ang II activa sus receptores AT1 produciendo como resultado la inducción de la producción de diversas ROS. La infusión de Ang II en ratas normotensas estimula la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  por la NADPH oxidasa en los vasos e induce una respuesta vasopresora (Griendling et al., 2000). La aldosterona y la ET-1 también pueden activar la NADPH oxidasa (Loomis et al., 2005). La ET-1 es un potente vasoconstrictor producido en diversos tejidos vasculares incluyendo el endotelio. Los efectos de la ET-1 están mediados por dos isoformas de receptores,  $\text{ET}_\text{A}$  y  $\text{ET}_\text{B}$ . La activación de los receptores  $\text{ET}_\text{A}$  provoca la contracción de los vasos sanguíneos a través de la activación de la NADPH oxidasa y la generación de ROS; la activación de los receptores  $\text{ET}_\text{B}$  conduce a la relajación de los vasos (Gomez-Alamillo et al., 2003). La ET-1 puede estimular la producción de ROS en la pared arterial tanto a través de receptores  $\text{ET}_\text{A}$  como  $\text{ET}_\text{B}$  (Sánchez et al., 2014). En los cardiomiocitos, la producción de ROS también es estimulada por la noradrenalina a través de receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos. Los receptores  $\alpha$ 1, AT1, y ET-1 son capaces de activar la NADPH oxidasa a través de la proteína G, induciendo la producción de ROS (Dammanahali y Sun, 2008; Majzunova et al., 2013).

Las ROS producidas por la NADPH oxidasa activan diversas vías de fosforilación celulares: las MAPK, las tirosin quinasas, y la PI3K/Akt. Estas vías de fosforilación activan factores de transcripción como la proteína activadora 1, la p53 y el NF- $\kappa$ B, que estimulan la transcripción de genes en el núcleo. Las proteínas codificadas por estos genes diana, a su vez median consecuencias celulares que conducen a cambios fenotípicos, como hipertrofia, inflamación, necrosis y apoptosis de las células y, por otro lado, a la estimulación de la producción de antioxidantes que participan en la defensa antioxidante (Griendling et al., 2000; Lee y Griendling, 2008).

Las MAPK pueden ser activadas por diversos estímulos extracelulares e intracelulares, como factores de crecimiento (Ang II, VEGF, PDGF) (Paravicini y Touyz, 2006), citocinas inflamatorias y el estrés celular (Son et al., 2011). Se ha demostrado que el aumento de la producción de ROS es responsable de la activación de la p38 MAPK, que podría estar involucrada en los cambios funcionales y estructurales asociados con la hipertensión (Muslin, 2008). Los posibles mecanismos de la activación de las MAPK incluyen: oxidación de residuos de cisteína de los receptores de factores de crecimiento y citoquinas, la modificación oxidativa de las quinasas intracelulares que participan en la cascada de señalización de las MAPK y la desactivación y la degradación de MAPK fosfatasas que mantienen la vía MAPK en estado inactivo (Son et al., 2011).

La activación de las tirosin quinasas por las ROS juega un importante papel en el remodelado del sistema cardiovascular asociado con la hipertensión. En las células de MLV y otras células, las ROS pueden activar tirosin quinasas no receptoras como la Janus quinasa 2 o la tirosin quinasa Src, o receptores de tirosin quinasas, como el receptor del EGF (Frank et al., 2000). En las células de MLV son de especial importancia el receptor de EGF y la Janus quinasa 2. El receptor de EGF es activado por Ang II a través de ROS. Su activación es necesaria para la activación de la ERK MAPK y para el crecimiento de las células de MLV (Eguchi et al., 1999). La Ang II y las ROS también activan la Janus quinasa 2 que es esencial para la inducción de citocinas y proteínas de choque térmico inducidas por trombina en células de MLV y para la posterior inducción de la respuesta inflamatoria (Madamanchi et al., 2001).

### 1.6.2. Estrés oxidativo y diabetes

El mantenimiento a largo plazo de los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango normal es una función fisiológica clave. El principal criterio de la homeostasis normal de la glucosa en los seres humanos es el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre por debajo de 100 mg/dl después del ayuno durante la noche. Si la glucemia en ayunas se eleva por encima de 100 mg/dl, pero no supera los 126 mg/dl, estos individuos son considerados como "pre-diabéticos". Si la regulación de la glucosa se deteriora aún más, y la glucemia en ayunas supera los 126 mg/dl, estos individuos pueden ser diagnosticados con diabetes franca (American Diabetes Association, 2010). La gran mayoría (90-95%) de los casos de diabetes corresponden a casos de diabetes tipo 2, una enfermedad caracterizada tanto por la reducción de la capacidad de la insulina para activar el sistema de transporte de glucosa en el músculo

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

esquelético (referido como "resistencia a la insulina") y una hiperinsulinemia compensatoria inadecuada para superar esta resistencia a la insulina (American Diabetes Association, 2010). La resistencia a la insulina en el músculo esquelético es un defecto temprano crítico que conduce al desarrollo inicial de tolerancia a la glucosa y posteriormente a la conversión de pre-diabetes a diabetes tipo 2 manifiesta (Henriksen et al., 2011).

La homeostasis de la glucosa se realiza mediante las funciones coordinadas de varios órganos, entre ellos el músculo esquelético, el hígado, el páncreas y el tejido adiposo. El hígado contribuye a la glucohomeostasis principalmente modificando la producción de glucosa hepática. El tejido adiposo participa en la eliminación de glucosa dependiente de insulina y también actúa como un órgano endocrino a través de la liberación de adipocinas. Las células  $\alpha$ - y  $\beta$ - pancreáticas son los sitios de síntesis y secreción de insulina y glucagón, respectivamente. El hipotálamo participa en la regulación neural de estos órganos (Henriksen et al., 2011).

La diabetes mellitus tipo 2, la forma más común de diabetes, se caracteriza por la deficiencia en la respuesta celular a la insulina. La disminución de la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo conduce a la hiperglucemia extracelular crónica que produce daño tisular y complicaciones fisiopatológicas, como enfermedad cardíaca, aterosclerosis, cataratas, retinopatía o daño nervioso periférico. El aumento del estrés oxidativo es uno de los principales desencadenantes inducidos por la hiperglucemia de complicaciones diabéticas. La hiperglucemia en un organismo induce la formación de ROS de una variedad de fuentes: fosforilación oxidativa, autooxidación de la glucosa, NADPH oxidasa, LOX, monooxigenasas del citocromo P450 y NOS (Valko et al., 2007).

La microcirculación coronaria se ve comprometida en la diabetes mellitus (Cersosimo y DeFronzo, 2006; Camici y Crea, 2007). Antes de que se establezcan los cambios morfológicos (Frisbee, 2007; Steep y Belin De Chantemele, 2007), puede producirse una disfunción vasomotora de los microvasos, que se considera como una de las primeras alteraciones que se producen en diversas enfermedades cardiovasculares (Cersosimo y DeFronzo, 2006; Camici y Crea, 2007). En seres humanos con diabetes mellitus, se establece una alteración de la función vasomotora de las grandes arterias de conductancia (De Vriese et al., 2000). En microvasos coronarios, se ha descrito que la vasodilatación en respuesta a bradiquinina mediada por el EDHF es similar en pacientes diabéticos y no diabéticos (Miura et al., 1999). Además, se ha descrito que la vasodilatación coronaria se encuentra conservada (Knudson et al., 2006) e

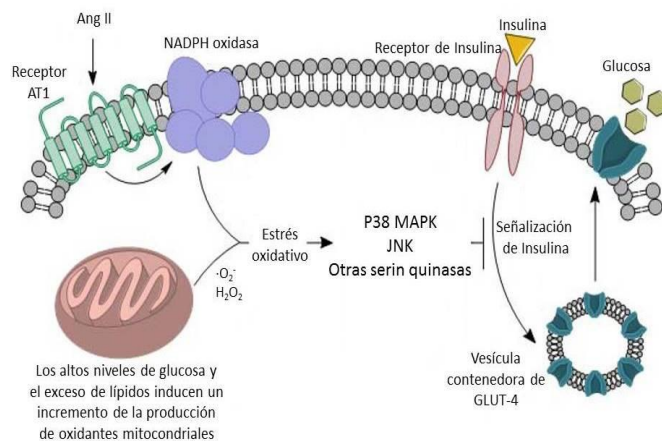
incluso aumentada (Prakash et al., 2006) en modelos animales de diabetes tipo 2. En comparación con los lechos vasculares periféricos, los microvasos coronarios son más resistentes a los cambios en la función vasomotora en estados de enfermedad (Knudson et al., 2007), debido a que los vasos coronarios poseen mecanismos que pueden operar de manera eficiente para proteger la función vasomotora. Se ha propuesto que las arteriolas coronarias presentan mecanismos eficaces que pueden compensar la pérdida de las vías vasodilatadoras en la diabetes tipo 2 (Fulop et al., 2007; Bagi et al., 2009).

El estrés oxidativo se desarrolla a partir de un desequilibrio entre la producción de oxidantes y la actividad antioxidante en las células y en el plasma. Este exceso de oxidantes se asocia con la etiología multifactorial de la resistencia a la insulina (Evans et al., 2005; Henriksen et al., 2011). En seres humanos se ha demostrado una asociación entre los marcadores plasmáticos de estrés oxidativo y el daño y el grado de resistencia a la insulina. Hay numerosas disfunciones sistémicas y celulares que pueden potencialmente contribuir a la sobreproducción de ROS (incluyendo la hiperglucemia y la dislipidemia) y pueden activar factores asociados con la acción reducida de la insulina. Además, el aumento de carbonilación y nitrosilación de proteínas en los tejidos sensibles a la insulina puede estar vinculado a la etiología de la resistencia a la insulina (Grimsrud et al., 2008; Muellenbach et al., 2009; Henriksen et al., 2011).

La mitocondria presenta una alta capacidad de producción de oxidantes, como el  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En condiciones de desequilibrio metabólico, la producción elevada de oxidantes mitocondriales está relacionada con la resistencia a la insulina (Anderson et al., 2009). En condiciones normales, los sitios clave de la formación de  $\cdot\text{O}_2^-$  en la membrana mitocondrial son el complejo I y la interfaz ubiquinona-complejo III. Sin embargo, la diabetes altera los lugares primarios de generación de  $\cdot\text{O}_2^-$  por lo que el complejo II se convierte en la fuente primaria de electrones que contribuyen a la formación de  $\cdot\text{O}_2^-$  en condiciones diabéticas (Valko et al., 2007). Además, el exceso de producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mitocondrial juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina en individuos sometidos a un excedente de energía a través del aumento de la grasa de la dieta. En el músculo esquelético tanto de ratas con resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en grasas y de seres humanos con obesidad mórbida y resistencia a la insulina, el potencial de emisión de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mitocondrial está incrementado, el estado redox es más oxidado, y la capacidad amortiguadora redox se encuentra disminuida en comparación con en el músculo esquelético de los respectivos grupos de control (Anderson et al., 2009; Henriksen et al., 2011).

Otra fuente de ROS en la diabetes es la NADPH oxidasa. Este grupo de enzimas son una fuente importante de producción de ROS inducida por glucosa en las células del sistema vascular y el riñón, lo que confirma a estas enzimas como mediadoras de complicaciones diabéticas. Dado que la hipertensión es una complicación común de la diabetes, es posible que la expresión de la NADPH oxidasa esté regulada de manera similar en ambos estos estados de enfermedad (Li y Shah, 2003). Tanto p47<sup>phox</sup> (el componente citosólico de la NADPH activada) como la formación de ROS inducida por glucosa se pueden bloquear con antagonistas del receptor de Ang II, lo que confirma un vínculo entre las dos vías de activación de la NADPH oxidasa. La producción de ROS mediada por la NADPH oxidasa en la diabetes puede ser inhibida por inhibidores de la PKC, lo que implica a esta familia de quinasas en la regulación de la actividad de la NADPH oxidasa inducida por hiperglucemia (Valko et al., 2007).

Los agentes oxidantes producidos en la mitocondria o a través de la NADPH oxidasa pueden, al menos en parte a través de un mecanismo dependiente de p38 MAPK, alterar el acoplamiento de los factores de señalización de insulina que regulan la translocación de GLUT-4. Esto resulta en última instancia, en una reducción de la capacidad de transporte de glucosa dependiente de insulina en los miocitos. La p38 MAPK es capaz de mediar el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir resistencia a la insulina (Kim et al., 2006). Cabe destacar que la p38 MAPK es sólo una de las muchas quinasas activadas por estrés (incluyendo JNK, GSK-3, y potencialmente IKKβ) que participan en el desarrollo de la resistencia a la insulina en el músculo esquelético debido a estrés oxidativo (Henriksen et al., 2011).



**Figura XII.** Sobreproducción de oxidantes derivados de la NADPH oxidasa y de la mitocondria en el músculo esquelético, con activación posterior de la p38 MAPK y otras quinasas activadas por estrés, asociado con la disminución de la señalización de la insulina y la reducción de la actividad del transportador de glucosa. Adaptado de: Henriksen et al., 2011.

La producción de ROS agota tanto los antioxidantes enzimáticos como no enzimáticos que conducen a la acumulación de ROS causando daño celular. La vitamina E, con efecto protector principalmente a través de la supresión de la peroxidación lipídica, está reducida en

la diabetes. En pacientes diabéticos los niveles de vitamina C se ven reducidos; sin embargo, la relación entre niveles reducidos de vitamina C y las complicaciones de la diabetes no está claro (VanderJagt et al., 2001; Valko et al., 2007).

Las células  $\beta$  de los islotes pancreáticos presentan unos niveles inusualmente bajos de SOD, catalasa y GPx (Grankvist et al., 1981). Esta situación inusual hace que estas células  $\beta$  sean particularmente sensibles al daño inducido por ROS, ya sean generadas por la interacción con citoquinas o niveles elevados de glucosa. Debido al bajo nivel de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes, las células  $\beta$  están en mayor riesgo de daño oxidativo que los tejidos con mayores niveles de protección antioxidante (Valko et al., 2007).

El estrés oxidativo que se produce en respuesta a la hiperglucemia (Bagi et al., 2004), la hiperinsulinemia (Erdös et al., 2002) y la hipertensión (Ungvari et al., 2004) se considera que es uno de los factores clave que conduce a la enfermedad microvascular en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. La diabetes tipo 2 se asocia con un aumento de la producción de ROS, que son responsables de la reducción de la biodisponibilidad de NO, interfiriendo con la señalización que ejerce. En ratas diabéticas tipo 2, la producción vascular de ROS está notablemente elevada, debido a una mayor actividad de la XO vascular. Esto da lugar a la alteración de la disponibilidad de NO y, por consiguiente, la reducción de la dilatación inducida por agonistas de los microvasos del músculo esquelético (Erdei et al., 2006; Bagi et al., 2009).

Las ROS actúan en el sistema vascular mediante la modulación de las vías específicas de transducción de señales en condiciones normales y patológicas. Las células endoteliales de los microvasos arteriales coronarios del corazón humano pueden generar  $H_2O_2$ , capaz de inducir dilatación arteriolar en los vasos coronarios (Miura et al., 2003). Los ratones con diabetes tipo 2 presentan un notable aumento de la producción de  $H_2O_2$  en la pared arteriolar (Erdei et al., 2007). Por lo tanto, además de inhibir la generación de NO endotelial, el  $H_2O_2$  puede participar activamente en los mecanismos de vasodilatación dependiente del endotelio en la diabetes mellitus tipo 2, mediante la activación de canales  $K_{Ca}$ , hiperpolarizando las células del MLV y por lo tanto actuando como EDHF (Matoba et al., 2003; Miura et al., 2003). También se ha descrito que la vasodilatación inducida por  $H_2O_2$  está mediada a través de la liberación de NO desde el endotelio (Hirai et al., 2000) o está parcialmente mediada por la liberación de GMPc (Fujimoto et al., 2001; Bagi et al., 2009);).

### 1.6.3. Estrés oxidativo y obesidad

Las alteraciones patológicas relacionadas con la obesidad, incluyendo la dislipidemia aterogénica, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia, deterioran la función vasomotora de las arterias. Los cambios morfológicos en microvasos son muy raros en la obesidad antes del desarrollo de hiperglucemia y diabetes mellitus tipo 2. El flujo sanguíneo rara vez se altera en la obesidad, a menos que se desarrolle aterosclerosis oclusiva de las arterias más grandes. Estudios recientes han revelado que la perfusión miocárdica y el flujo sanguíneo del músculo esquelético se ven comprometidos en sujetos obesos, especialmente cuando los vasos sufren cambios farmacológicos o metabólicos. Este flujo sanguíneo anormal se debe principalmente a que la capacidad vasodilatadora de los microvasos se ve reducida, representando en algunos casos un importante marcador de riesgo cardiovascular y pudiendo contribuir a la patogénesis de la obesidad (Bagi et al., 2012).

El sobrepeso y la obesidad se asocian con una vasodilatación dependiente de endotelio alterada. La obesidad se asocia con disfunción endotelial a través de mecanismos indirectos, como la resistencia a la insulina y la asociación con factores de riesgo (como la diabetes mellitus, la hipertensión y la dislipidemia) (Bakker et al., 2009), y a través de mecanismos directos, incluyendo la producción de adipocinas y citocinas proinflamatorias y niveles elevados de ácidos grasos libres, que a su vez inducen estrés oxidativo que conduce a una disminución de la biodisponibilidad de NO (Viridis et al., 2011). En la obesidad, al igual que en otras condiciones de riesgo vascular, se produce un desequilibrio entre los factores endoteliales vasodilatadores y vasoconstrictores (Prieto et al., 2014).

En individuos obesos se ha observado una reducción de las respuestas vasodilatadoras dependientes del endotelio a agonistas y al flujo (Parikh et al., 2009; Sturm et al., 2009) y una perfusión muscular plana en respuesta al ejercicio (Karpoff et al., 2009). Del mismo modo, en diversos modelos experimentales de obesidad, se han observado respuestas vasodilatadoras deterioradas evocadas por agonistas, flujo, hiperemia funcional reactiva e hipoxia (Phillips et al., 2005; Prieto et al., 2014).

Las arterias mesentéricas de resistencia (Oltman et al., 2006) y lechos vasculares del músculo esquelético (Frisbee y Stepp, 2001) de ratas Zucker obesas (RZO) presentan alteración de la vasodilatación dependiente del endotelio similar a la disfunción microvascular en pacientes obesos. Se ha demostrado que en las arteriolas mesentéricas la relajación dependiente del endotelio a acetilcolina encuentra preservada a las 20 semanas de edad, pero

se reduce en RZO de mayor edad (32 semanas), lo que sugiere la progresión dependiente de la edad de la disfunción vasomotora (Subramanian y MacLeod, 2003). También se ha descrito una dilatación reducida a la acetilcolina en arterias mesentericas (Naderali et al., 2001) y músculo esquelético (Erdei et al., 2006) en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas. Estos estudios pusieron de manifiesto la disfunción microvascular en modelos experimentales de obesidad concluyendo que la reducción de la dilatación de las arterias de resistencia se debe principalmente a alteraciones funcionales del endotelio microvascular (Bagi et al., 2012).

El endotelio vascular produce y secreta numerosos compuestos que regulan una gran variedad de funciones fisiológicas, incluyendo el tono vasomotor, la coagulación, la inflamación, la permeabilidad y la adhesión celular. El NO se considera que es una de las moléculas clave en el mantenimiento de la homeostasis vascular normal (Bagi et al., 2012). En la disfunción endotelial asociada a la obesidad, la biodisponibilidad y la señalización ejercida por el NO se ven comprometidas. Esto puede producirse a través de varios mecanismos, incluyendo la reducción de la expresión o actividad de la eNOS, el desacoplamiento de la eNOS, o el aumento de la eliminación del NO por el aumento de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Prieto et al., 2014). El estrés oxidativo que se produce en respuesta a la hiperglucemia y la hipertensión se considera que es uno de los factores clave que conduce a la reducción de la disponibilidad de NO (Erdös et al., 2002; Bagi et al., 2004; Ungvari et al., 2004). También se ha descrito que la resistencia a la insulina y la obesidad están asociados con un aumento de la producción vascular de ROS. En este contexto, el aumento de la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  vascular conduce a la inactivación del NO endotelial. En ratas alimentadas con una dieta rica en grasas también se ha encontrado una mayor producción vascular de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Erdei et al., 2006), que se ha asociado con una reducción en la vasodilatación de las arteriolas del músculo esquelético inducida por acetilcolina e histamina y mediadas por NO (Bagi et al., 2012; Prieto et al., 2014).

La formación de NO endotelial puede ser estimulada por vasodilatadores como la acetilcolina o la bradiquinina, que activan la eNOS actuando sobre receptores acoplados a proteínas G; o también por la modificación postraslacional de la eNOS a través de la fosforilación en el residuo Ser1177 por serin quinasas incluyendo la Akt quinasa (Huang, 2009). La fosforilación de eNOS por esta enzima es estimulada por la insulina y otros agentes, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular, y también por factores mecánicos como la tensión de cizalla o el aumento de flujo. La obesidad se asocia con la resistencia a la fosforilación de la eNOS y la reducción de relajación dependiente de NO. Sin embargo, la vía de

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

señalización de la Pi3K/Akt/fosforilación de la eNOS en el endotelio arterial coronario se encuentra preservada y regulada al alza en arterias coronarias de RZO (Contreras et al., 2011).

La COX metaboliza el ácido araquidónico en prostanoideos vasodilatadores (PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) y vasoconstrictores (TXA<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>). En vasos sanguíneos sanos, la COX-1 (COX endotelial constitutiva) forma la mayoría de los prostanoideos, mientras que la COX-2 es una isoforma inducible regulada por estímulos inflamatorios, mitógenos y físicos (Warner y Mitchell, 2004). Un desequilibrio entre la producción de prostanoideos vasodilatadores y vasoconstrictores también puede contribuir a la disfunción endotelial y reactividad anormal en células de MLV. La obesidad aumenta la vasoconstricción dependiente de la COX, como se describió por primera vez en los estudios clínicos que muestran el efecto potenciador del bloqueo de la COX con indometacina en la inhibición de la vasodilatación inducida por acetilcolina en sujetos obesos (Perticone et al., 2001). El aumento en la producción de TXA<sub>2</sub> y la actividad del receptor TP también han sido implicados en la inhibición de la vasodilatación hipóxica (Goodwill et al., 2008) de las arteriolas del músculo esquelético de RZO.

El EDHF juega un papel clave junto con el NO y la PGI<sub>2</sub> en la relajación dependiente de endotelio principalmente en arterias pequeñas, mediante el aumento de la conductancia del K<sup>+</sup> y la promoción de la propagación de la hiperpolarización en el músculo liso subyacente. En la obesidad se han descrito respuestas vasodilatadoras tanto inhibidas como preservadas. En pacientes obesos, los aumentos de flujo inducidos por la bradicinina, independientemente de la inhibición de la NOS y la COX, fueron inhibidos por ouabaína y bloqueadores de los canales de K<sup>+</sup> (Vigili de Kreutzenberg et al., 2003). Por otro lado, se ha sugerido que el EDHF puede compensar la reducción de la biodisponibilidad de NO en la obesidad en base a estudios que demuestran un efecto relajante inducido por agonistas y por el flujo conservado o aumentado (Focardi et al., 2007; Prieto et al., 2014).

En comparación con el NO, la vasodilatación arteriolar mediada por el EDHF es menos sensible al estrés oxidativo. En este contexto, la vasodilatación mediada por el EDHF puede persistir e incluso compensar la pérdida de la vasodilatación mediada por NO en la obesidad. En este contexto, Ellis y colaboradores (2008) describen una dilatación mediada por EDHF aumentada en arterias mesentéricas en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. Se ha descrito una vasodilatación mantenida inducida por acetilcolina y mediada por EDHF en arteriolas coronarias de ratas obesas alimentadas con dieta de alto contenido en grasa (Feher et al., 2010; Bagi et al., 2012).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La disfunción endotelial en la obesidad también se ha caracterizado por incrementos en los niveles y actividad de factores vasoconstrictores endoteliales proaterogénicos, en particular de la ET-1. En pacientes obesos con Síndrome Metabólico (SM) se han encontrado niveles plasmáticos circulantes elevados de ET-1 (Ferri et al., 1997) y la administración de antagonistas selectivos de los receptores de dicho péptido produce una vasodilatación significativa en sujetos obesos (Mather et al., 2002). El incremento en la actividad vasoconstrictora mediada por endotelina endógena está correlacionada con el índice de masa corporal (Cardillo et al., 2004) y es de especial relevancia en los vasos sanguíneos periféricos. Por otra parte, cuando el receptor de endotelina se encuentra bloqueado, la inhibición de la síntesis de NO induce una mayor vasoconstricción en individuos obesos, pero no en individuos diabéticos tipo 2, desenmascarando una capacidad de síntesis de NO incrementada y que sugiere que la alteración de la biodisponibilidad de NO endógeno inducida por ET-1 puede contribuir a la disfunción endotelial en la obesidad (Mather et al., 2004). Asimismo, se ha demostrado un incremento en la producción de ROS estimulada por ET-1 que disminuye la biodisponibilidad de NO y las relajaciones endoteliales en arterias de resistencia de modelos experimentales de obesidad genética (Sánchez et al., 2014).

El estrés oxidativo también contribuye al deterioro de las relajaciones arteriales mediadas por prostanoïdes en la obesidad, como se muestra por los efectos beneficiosos de los *scavengers* de ROS en la inhibición de las respuestas vasodilatadoras hipóxicas que implican la prostaciclina y confirmado por la producción atenuada de PGI<sub>2</sub> asociada al aumento de la nitración de residuos de tirosina de la prostaciclina sintasa en las arteriolas del músculo esquelético de RZO (Goodwill et al., 2008). La NADPH oxidasa es una fuente importante de generación de ROS vascular en la obesidad. La expresión de la subunidad reguladora de esta enzima, p47<sup>phox</sup>, y del factor de transcripción sensible al estado redox, NF-κB, se encuentra incrementada en células endoteliales y se ha correlacionado con el índice de masa corporal y la grasa corporal total en individuos obesos (Silver et al., 2007). La producción de ROS endotelial derivada de la XO también se ha implicado en el estrés oxidativo vascular en la obesidad, y la inhibición de esta enzima reduce de manera notable la generación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Ketonen et al., 2010) y restaura la relajación dependiente de endotelio (Erdei et al., 2006) en arterias de animales obesos (Prieto et al., 2014).

El exceso de producción de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> vascular se deriva de diferentes sistemas de producción de ROS, incluyendo la NADPH oxidasa, la XO, la eNOS desacoplada y los complejos respiratorios mitocondriales (Wolin, 2000). La fuente primaria de ROS microvascular aún no ha

sido identificada en la obesidad. Parece que la obesidad podría conducir a la activación de la XO vascular y de la NADPH oxidasa, aunque todavía no está dilucidada su contribución relativa al incremento de la producción de ROS. Es posible que la fuente de ROS varíe en los diferentes lechos vasculares y en diversos modelos animales de obesidad. Además, el  $\cdot\text{O}_2^-$  derivado de la NADPH oxidasa podría conducir a la activación dependiente del estado redox e irreversible de la XO (Berry y Hare, 2004). Las ROS, ya sean derivadas de la NADPH oxidasa o de la XO, pueden reducir los niveles del cofactor de la NO sintasa, la  $\text{BH}_4$ , que a su vez conduce desacoplamiento de la NO sintasa y la consiguiente generación de  $\cdot\text{O}_2^-$  por la NO sintasa (Alp y Channon, 2004). Esto sugiere la existencia de múltiples enzimas que causan aumento de la producción de ROS microvascular en la obesidad (Bagi et al., 2012).

El incremento de ROS derivado de la NADPH oxidasa y XOR puede conducir al desacoplamiento de la eNOS que a la larga contribuye al estrés oxidativo vascular y a la disfunción endotelial. El  $\text{ONOO}^-$  produce el desacoplamiento de la eNOS a través de la reducción del sustrato de la eNOS, la L-arginina, por oxidación de su precursor  $\text{BH}_4$  y mediante la activación de la degradación de la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de  $\text{BH}_4$ , la GTP ciclohidrolasa (Zou et al., 2002; Landmesser et al., 2003).

Se ha postulado que la alteración de la función de las enzimas productoras de ROS en la obesidad podría surgir de los efectos adversos de los factores derivados del tejido adiposo. En la obesidad, la función endocrina de los adipocitos está alterada y puede manifestarse con niveles reducidos de adiponectina (Kadowaki y Yamauchi, 2005) y niveles elevados tanto circulantes como tisulares de leptina, IL-6 y TNF- $\alpha$  (Berg y Scherer, 2005). Se ha demostrado que la leptina promueve el estrés oxidativo en células endoteliales cultivadas (Korda et al., 2008). Por otra parte, el TNF- $\alpha$  ha sido implicado en el desarrollo de disfunción arterial coronaria en RZO a través del aumento de la producción de ROS derivadas de la NADPH oxidasa (Picchi et al., 2006). Se ha demostrado que la IL-6 es capaz de regular la expresión del gen del receptor de la Ang II, que produce un aumento de la producción de ROS mediada por Ang II en células del MLV (Wassmann et al., 2004). En el estudio de Payne y colaboradores (2010), la leptina produjo la reducción de la vasodilatación coronaria inducida por la bradicinina en un modelo porcino de SM.

La obesidad se asocia de forma independiente con la hipertrofia ventricular izquierda (Abel et al., 2008). Esto se considera que es una adaptación temprana de la función cardíaca, que se acomoda a la mayor demanda hemodinámica y metabólica de la obesidad. La

adaptación cardíaca en la obesidad implica cambios en la circulación coronaria, con objeto de proporcionar un flujo de sangre adecuado para satisfacer el aumento de la demanda metabólica. En la circulación coronaria, el flujo de sangre satisface los requerimientos metabólicos mediante la coordinación de la resistencia vascular de los vasos de diferentes tamaños, que se coordina a través del control del flujo miogénico o del diámetro arterial (Chillian, 1997). La resistencia al flujo sanguíneo aumenta a medida que disminuye el diámetro de los vasos; en seres humanos, este control es ejercido por arterias de diámetro inferior a 300 mm.

El tono miogénico intrínseco también establece un diámetro de reserva que permite que los microvasos se dilaten en respuesta a estímulos metabólicos, neuronales y otros estímulos vasomotores. Las arteriolas coronarias del corazón de pacientes obesos exhiben una reducción de la vasodilatación inducida por bradiquinina dependiente del endotelio (Fulop et al., 2007). Oltman y colaboradores (2006) han investigado la progresión de la disfunción arterial coronaria en RZO, demostrando que la dilatación arteriolar coronaria a la acetilcolina está preservada en animales de 16-24 semanas de edad, pero se encuentra reducida en ratas de 28-36 semanas.

A pesar de que de los estudios en grandes arterias de conducción sugieren efectos perjudiciales de la obesidad sobre la respuesta vascular (Kapiotis et al., 2006), el tono vasomotor y la función vasodilatadora estimulada por agonistas en microvasos coronarios puede permanecer intacto, especialmente en los estados precoces de enfermedad. Este fenómeno implica que en la obesidad, los mecanismos vasoregulatorios intrínsecos de la pared microvascular están protegidos de esos factores patológicos que son perjudiciales para otros tipos de vasos periféricos. Se sabe que la función vasodilatadora de las pequeñas arterias coronarias es mediada por la liberación de autacoides del endotelio incluyendo NO y EDHF. La disponibilidad endotelial de NO se reduce en arteriolas coronarias en la obesidad; esto, sin embargo, es compensado por otros mecanismos vasculares. Las ROS que en vasos periféricos pueden dañar la función microvascular, pueden actuar como vasodilatadoras en la microcirculación coronaria. En este contexto, Matoba y colaboradores (2003) demostraron que el  $H_2O_2$  es un importante factor dilatador liberado del endotelio en microvasos coronarios porcinos. Las células endoteliales de los microvasos arteriales coronarios humanos también generan  $H_2O_2$ , que contribuye a la dilatación arteriolar coronaria (Miura et al., 2003). Además, el  $H_2O_2$  puede mantener la función dilatadora de las arterias coronarias en la obesidad, incluso si la biodisponibilidad de NO se encuentra reducida (Bagi et al., 2012).

## 2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y CALCIO

### 2.1. Homeostasis del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular

La presencia y la regulación del catión divalente  $\text{Ca}^{2+}$  son de fundamental importancia para las funciones vitales a nivel celular. Gran parte de la energía se gasta en la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma y en el secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  en RS o el retículo endoplásmico (RE), las mitocondrias, y el espacio extracelular (para mantener una concentración baja de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol). Los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las membranas plasmáticas permiten desarrollar importantes funciones del metabolismo, como la propagación nerviosa o la contracción muscular. El  $\text{Ca}^{2+}$  también tiene una importancia fundamental en la regulación de la transcripción, la traducción, la división celular y la apoptosis (Firth et al., 2007; Gerthoffer, 2007). La regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, tanto en el citoplasma como en los orgánulos está involucrada de forma fundamental en muchos procesos fisiopatológicos, incluidas enfermedades que afectan al sistema vascular (Firth et al., 2007; Roderick y Cook, 2008; Song et al., 2011).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en diferentes compartimentos intracelulares y el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  entre los compartimentos son de gran importancia en la función de las células de MLV y células endoteliales. Las células de MLV y las células endoteliales son las células principales en la determinación del tono vascular y el diámetro de los vasos sanguíneos, por tanto, la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es de gran importancia para la función del sistema vascular. Las anomalías en la regulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y las elevaciones en el  $\text{Ca}^{2+}$  en reposo se han relacionado con la hipertensión arterial pulmonar y sistémica (Song et al., 2011).

El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (y la membrana del RS) se lleva a cabo por medio de diversos canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , bombas e intercambiadores. La permeabilidad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  permite el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mediante su gradiente electroquímico, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  en contra de gradiente de concentración utilizando la energía producida por el ATP, y los intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}$  que pueden transportar  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana utilizando gradientes electroquímicos transmembrana de otros iones (Song et al., 2011).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es 1,6-1,8 mM, mientras que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica es de  $\approx 100$  nM. Varios transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  están funcionalmente

implicados en el mantenimiento del gradiente de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de membranas y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Gill et al., 2006). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en los almacenes intracelulares, como el RS, pueden llegar a 1 mM debido a la actividad de las bombas de membrana del RS (es decir, la SERCA), que utiliza la energía producida por el ATP para el transporte (o recaptación) de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al RS. Además, el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular también está regulado por muchos otros transportadores, como el NCX y los intercambiadores  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática y la membrana del RS/RE, y los uniportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana mitocondrial (Gill et al., 2006; Song et al., 2011).

La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmática puede aumentar mediante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS a través de los IP<sub>3</sub>R y los RyR en la membrana del RS/RE, y el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través diferentes canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática. Hay tres grandes canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática que se expresan funcionalmente en las células de MLV: (a) canales VOC (Catterall, 2000), que se abren por despolarización de la membrana, (b) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (ROC) que se abren por el diacilglicerol (DAG) sintetizado a partir del fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP<sub>2</sub>) y otros mensajeros intracelulares cuando los receptores de membrana son activados por ligandos (Montell, 2005; Pedersen et al., 2005), y (c) canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por depósitos (SOC) que se abren cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (por ejemplo el RS) se agota, mediante la activación de los IP<sub>3</sub>R/RyR y la inhibición de la SERCA en la membrana del RS (Song et al., 2011).

Aunque la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y la proporción de  $\text{Ca}^{2+}$  unida a calmodulina (CaM) en el núcleo son importantes en la regulación de diversos factores de transcripción implicados en la fisiología y fisiopatología de las células de MLV, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el compartimento nuclear no está regulada y es aproximadamente igual a la del compartimento citosólico, debido al flujo libre a través de grandes poros nucleares. Gracias al secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS/RE y, en menor medida, en las mitocondrias, y a la expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al espacio extracelular, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma se mantiene a un nivel bajo de tal manera que la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior de la célula o la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los depósitos no requiere energía y funciona como un evento de señalización para la contracción celular, la migración y la proliferación. En las células de MLV, un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  conduce a la contracción celular, aumenta la migración celular y estimula la proliferación celular. Por lo tanto, un aumento agudo en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  puede causar vasoconstricción, mientras que los niveles crónicamente elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico conducen al engrosamiento de la pared del vaso (debido a su efecto estimulante sobre la proliferación

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

celular y la migración), disminuyendo así la luz vascular y la capacidad del vaso para dilatarse en respuesta al aumento del flujo sanguíneo (Song et al., 2011).

Debido a que un aumento prolongado en la  $[Ca^{2+}]_i$  es generalmente tóxico, el transporte de  $Ca^{2+}$  fuera del citosol rápido y regulado es de vital importancia (Orrenius et al., 2003). Las bombas iónicas localizadas en la membrana plasmática, como las PMCA son necesarias para la extrusión eficiente de  $Ca^{2+}$ . Además, el NCX también juega un papel importante. Bajo ciertas condiciones pueden revertir su modo de acción y contribuir a un incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Berridge et al., 2000; Clapham, 2007). Además de la extrusión de  $Ca^{2+}$  en el espacio extracelular, los depósitos intracelulares de  $Ca^{2+}$  también juegan un papel importante en la regulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ . Los depósitos más destacados son el lumen del RE y las mitocondrias (Bogeski et al., 2011).

En las mitocondrias, el ciclo de los iones  $Ca^{2+}$  entre el citosol y la matriz mitocondrial regula la función de los orgánulos y la producción de ATP (Duchen, 2000; Rizzuto y Pozzan, 2006). Durante este proceso los iones  $Ca^{2+}$  tienen que cruzar dos membranas: la membrana mitocondrial externa e interna. La membrana mitocondrial externa es porosa y por lo tanto no juega un papel importante en la entrada mitocondrial de  $Ca^{2+}$ , aunque el canal de aniones dependiente de voltaje podría desempeñar un importante papel indirecto en la homeostasis mitocondrial del  $Ca^{2+}$  (Bathori et al., 2006; Tan y Colombini, 2007). En la membrana mitocondrial interna se han propuesto dos vías principales de transporte de  $Ca^{2+}$ . Uno se activa a concentraciones relativamente altas de  $Ca^{2+}$  en el espacio intramembrana y se lleva a cabo por un canal muy selectivo conocido como uniportador de  $Ca^{2+}$  mitocondrial. La segunda vía tiene mucha menor capacidad de transporte pero mayor sensibilidad al  $Ca^{2+}$  y se lleva a cabo por varios canales o transportadores todavía no bien caracterizados (Santo-Domingo y Demaurex, 2010).

Los depósitos del RE contienen  $Ca^{2+}$  a una concentración de  $\approx 0,5$  mM, que puede ser liberado rápidamente al citosol a través del IP3R o el RyR (Berridge, 2002; Foskett et al., 2007). El llenado de estos depósitos de  $Ca^{2+}$  se consigue a través de las SERCA que bombean  $Ca^{2+}$  de nuevo al RE, ya que parte del  $Ca^{2+}$  se escapa constantemente a través de la membrana del RE (Tu et al., 2006; Guerrero-Hernandez et al., 2010; Bogeski et al., 2011).

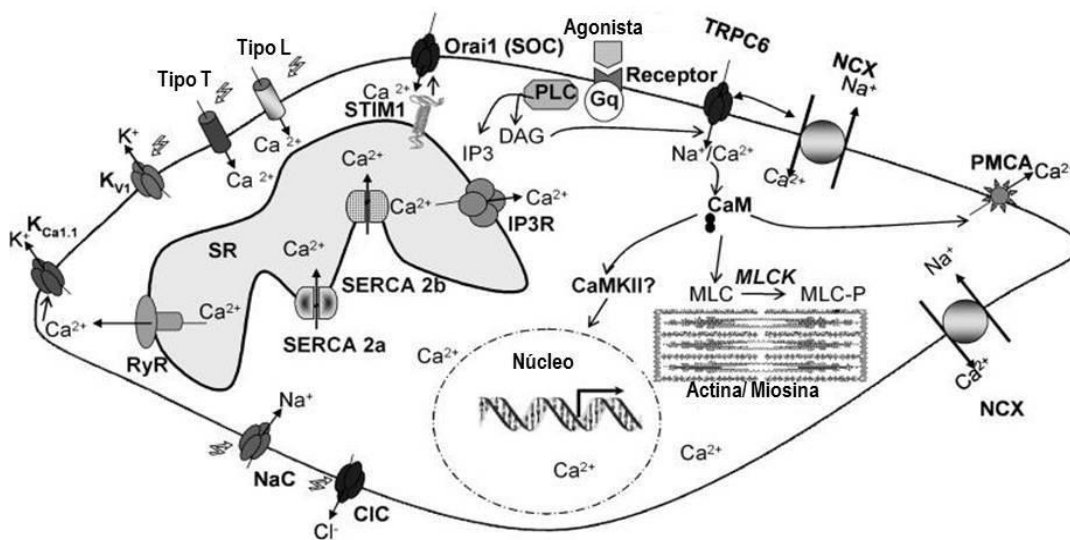
## 2.2. Señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en la pared vascular

A diferencia de los miocitos cardiacos, las células de MLV se caracterizan por contracciones relativamente lentas que, en algunos casos, se mantienen durante largos períodos de tiempo. Esto es debido a la capacidad de las células de MLV de utilizar gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a concentraciones intracelulares bajas de  $\text{Ca}^{2+}$  y por tanto mantener la contracción (Trebak et al., 2010).

Las células de MLV generan contracciones rítmicas resultantes de una compleja interacción entre canales iónicos, bombas y transportadores que incrementan la concentración intracelular global de  $\text{Ca}^{2+}$  que se desplaza de forma longitudinal. La contractilidad de las células de MLV *in vivo* está bajo el control de una gran cantidad de agonistas neuronales y humorales que generalmente actúan a través de receptores de membrana que activan la fosfolipasa C (PLC) para producir IP<sub>3</sub>, produciendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS a través del IP<sub>3</sub>R (Berridge, 2008). Estas fluctuaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidas por agonistas son necesarias para el inicio de la contracción de las células de MLV. Debido a que los almacenes internos de  $\text{Ca}^{2+}$  son limitados, el aumento sostenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en las células de MLV depende de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales situados en la membrana plasmática, necesarios para reponer el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del RS después de cada ciclo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Trebak et al., 2010).

Existe una amplia variedad de canales en la membrana plasmática que han sido implicados en este proceso; no obstante, los canales VOC tipo L juegan un papel importante en el aumento de los niveles globales de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la contracción de las células de MLV (Berridge, 2008). La despolarización de la membrana plasmática necesaria para la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L podría lograrse a través de la activación de canales iónicos activados por agonistas no selectivos, como son los constituidos por las diferentes isoformas del receptor de potencial transitorio catiónico (TRPC) (Soboloff et al., 2005). Por otra parte, pequeños grupos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L persistentemente activos que operan en un modo de alta probabilidad de apertura, podrían contribuir a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de MLV en estado de reposo (Perez y Sanderson, 2005; Berridge, 2008). Otra clase de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los activados por voltaje tipo T (llamados así por la naturaleza transitoria de sus corrientes) podrían contribuir a la entrada global de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso de las vías aéreas (Berridge, 2008). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de la membrana plasmática activa, a través del proceso de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , a los RyR del RS, induciendo una

liberación adicional de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, la activación del IP3R a través de la producción de IP3 inducida por agonistas y la sensibilización del IP3R por el  $\text{Ca}^{2+}$  podría inducir una mayor liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos ciclos de regeneración de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mantenidos por los canales de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca un aumento global de  $\text{Ca}^{2+}$  en forma de onda a lo largo de la célula que conduce a la iniciación de la respuesta contráctil a través de la activación de la MLCK dependiente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  puede activar canales de  $\text{Cl}^-$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , contribuyendo a la despolarización y la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, generándose un circuito de retroalimentación positiva (Berridge, 2008). A través de las uniones gap o uniones hendidura, la despolarización puede llegar a las células vecinas, activando sus canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y ayudando a sincronizar la onda de contractilidad a lo largo del vaso (Berridge, 2008; Trebak et al., 2010).



**Figura XIII. Canales y transportadores de iones en el músculo liso vascular.** Las células de MLV expresan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, los principales contribuyentes de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ; también expresan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T. Los principales canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS de las células de MLV incluyen los RyR y los IP3R. Los agonistas vasoactivos, mediante la unión a sus receptores específicos, median la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la unión del IP3 al IP3R así como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de SOC y canales activados por segundos mensajeros, como TRPC6. Los canales SOC están codificados por Orai1 y se activan a través de la agregación mediada por el agotamiento de los depósitos del sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS, STIM1, y su interacción directa con los canales Orai1. El aumento global de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de las células de MLV son necesarios para la contracción y la transcripción de genes *de novo* mediante la activación de quinasas  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  dependientes, como CaMKII y MLCK. Se ha propuesto el acoplamiento directo entre los canales no selectivos TRPC y el NCX. La entrada de  $\text{Na}^+$  a través de canales TRPC6 podría dar lugar a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en células de MLV a través del NCX operando en modo inverso. Los canales de  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  activados por voltaje pueden despolarizar las células de MLV, causando la posterior activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Los canales de  $\text{K}^+$  activados por voltaje y activados por  $\text{Ca}^{2+}$  pueden limitar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células de MLV produciendo hiperpolarización de la célula. Las bombas SERCA y PMCA son responsables del aclaramiento de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma mediante el bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  al RS y fuera de la célula, respectivamente. Adaptado de Trebak et al., 2010.

La reversión de la contractilidad de las células MLV o vasorrelajación se logra a través de mecanismos que limitan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática en combinación con el aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. La discreta liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  subplasmalémica a través del RyR, reduce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L mediante la activación de canales  $\text{K}_{\text{Ca}}$  y causando hiperpolarización (Hill-Eubanks et al., 2011). El aclaramiento de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma depende de la acción de la SERCA y la PMCA que bombean  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el retículo y fuera de la célula, respectivamente (Trebak et al., 2010).

### 2.2.1. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por voltaje

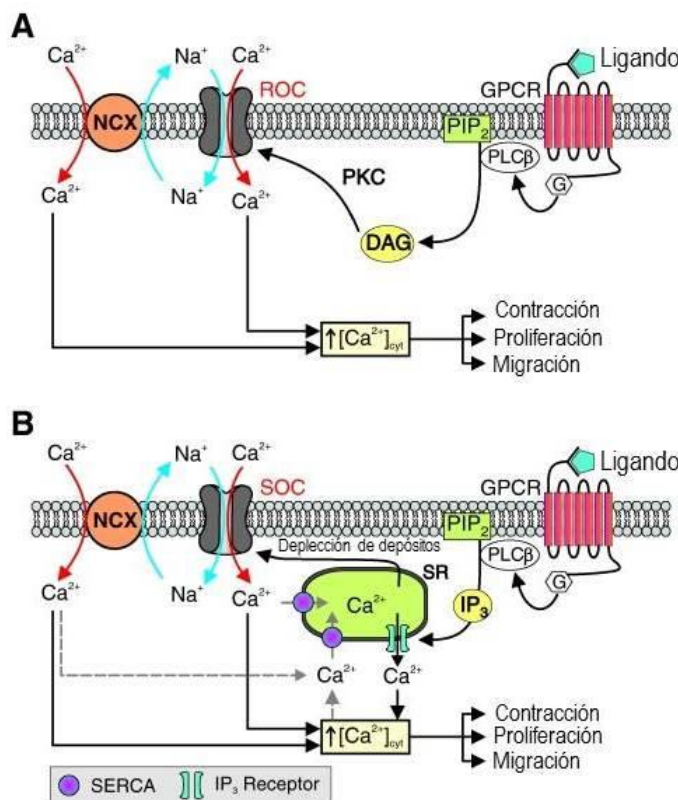
La familia de canales VOC consiste en 5 subgrupos principales conocidas como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Cav1.1-1.4), tipo-N (Cav2.2), tipo P/Q (Cav2.1), tipo R (Cav2.3), y tipo T (Cav3.1-3.3). Se expresan en muchos tipos de células y son responsables de diversas funciones celulares como la contracción muscular, el control del potencial de acción, la secreción, o la expresión génica.

El potencial de membrana de las células de MLV es crítico en el control de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Los canales VOC de tipo L de la membrana plasmática se abren por despolarización de la membrana y permiten el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma. Este aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  activa la MLCK y, finalmente, provoca la contracción del músculo liso. En arterias aisladas, una solución de alta concentración de  $\text{K}^+$  causa una contracción sostenida, que es principalmente debida a la despolarización de la membrana y la apertura de canales VOC en las células de MLV (Bogeski et al., 2011).

### 2.2.2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ operados por receptor (ROC) y operados por depósito (SOC)

La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  también se ve afectada por la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales ROC y SOC en la membrana plasmática. La activación de receptores de membrana, por ejemplo, receptores acoplados a proteína G, y receptores de tirosin quinasa, conducen a una mayor síntesis de DAG e IP3. El DAG abre los canales ROC, promueve la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por receptor, y el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . El IP3R activado por el IP3 en la membrana del RS/RE,

media la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  o la movilización de las reservas intracelulares al citosol y aumenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . La depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  de los almacenes intracelulares por la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por  $\text{IP}_3$  abre los canales SOC en la membrana plasmática e induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por depósitos, que también se conoce como *entrada capacitiva* de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además de activar la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares a través de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por  $\text{IP}_3$ , el vaciamiento pasivo de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS/RE por la inhibición de la SERCA con CPA o tapsigargina también puede activar los canales SOC e inducir la entrada SOC en el MLV y en las células endoteliales (Song et al., 2011).



**Fig XIV. Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  ROC y SOC.** (A) La señal del receptor acoplado a proteína G, a través de segundos mensajeros como el DAG, abre los ROC en la membrana plasmática. La afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los ROC incrementa la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y conduce a la contracción de las células de MLV, la proliferación y la migración. (B) El segundo mensajero  $\text{IP}_3$  activa los  $\text{IP}_3\text{R}$  en la membrana del RE y produce la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS al citosol. El agotamiento subsiguiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos abre los SOC en la membrana plasmática. Además, el aumento de la  $[\text{Na}^{+}]$  citosólica debido a la afluencia de  $\text{Na}^{+}$  a través de ROC y SOC puede activar el modo inverso del NCX y transportar el  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior. Adaptado de Song et al., 2011.

### Canales TRP

Se ha demostrado que los ROC y SOC funcionales están formados por subunidades de los canales de potencial de receptor transitorio (TRP). Los TRPC constituyen una de las principales subfamilias del grupo de canales TRP. Hasta la fecha, se han identificado 28 TRP de mamíferos, que se puede dividir en seis subfamilias: TRPC (canónico), TRPM (melastatina), TRPV (vanilloide), TRPA (anquirin), TRPP (policistina), y TRPML (mucolipina). Los TRPC están formados por siete miembros (TRPC1-7) que se han propuesto como candidatos potenciales

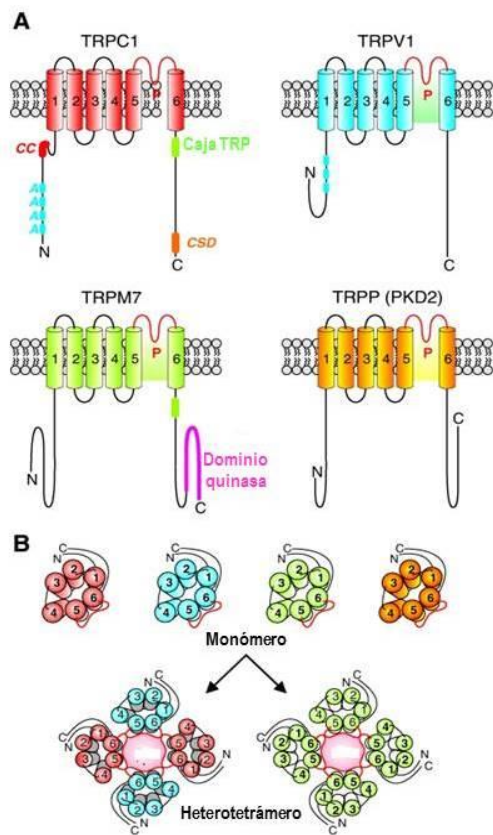
para los canales tipo SOC y no SOC, en virtud de su activación por mecanismos de señalización que incluyen la vía de la PLC (Smyth et al., 2006; Trebak et al., 2007). Estos canales tienen una conductancia estimada de 3.2 pS, siendo selectivos para cationes, pero no discriminan entre los mono- y divalentes. TRPC1 está involucrado en la entrada SOC en líneas celulares de MLV (Brueggemann et al., 2006), y en las células de MLV de arterias y venas aisladas de diversas especies (Parekh y Putney, 2005). Un estudio en células de MLV de arteria pulmonar humana demostró que la inhibición de la expresión de TRPC1 disminuye la entrada SOC (Sweeney et al., 2002). Sin embargo, existe controversia en la participación de las proteínas TRPC en los canales SOC. Dietrich y colaboradores (2007) han descrito que las corrientes SOC en células de MLV están intactas en ratones *knockout* para TRPC1 y la repleción de los depósitos internos de  $\text{Ca}^{2+}$  fue normal en ratones *knockout* para TRPC3 (Hartmann et al., 2008).

Una hipótesis menos controvertida es que los TRPC codifican canales no selectivos de cationes independientes de los depósitos. Se ha demostrado que el DAG activa a los miembros de las subfamilias TRPC3/6/7 cuando se expresan de forma ectópica en líneas celulares (Trebak et al., 2003). Inoue y colaboradores (2001) demostraron la participación de TRPC6 en la activación endógena de entrada de cationes no SOC mediada por DAG controlada por los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos en el músculo liso de la vena porta de conejo. Los estudios de Rosker y colaboradores (2004) sugirieron un acoplamiento físico y funcional de TRPC3 con el NCX cardíaco en el control de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ . Tras la estimulación de receptores acoplados a PLC, la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de canales TRPC3 desencadena la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del NCX operando en modo inverso (Eder et al., 2007; Trebak et al., 2010).

Los canales TRP son canales de cationes que median principalmente la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática (Barritt, 1999). La afluencia de cationes al citoplasma despolariza las células y es necesario para potenciales de acción en células excitables, como las neuronas (Tessier-Lavigne y Goodman, 1996). En células no excitables, la despolarización de la membrana por los canales TRP estimula los canales dependientes de voltaje ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ) influenciando muchos eventos celulares como la transcripción y la traducción (Clapham, 1995), mientras que el aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales TRP está involucrado en la contracción celular mediada por ligando, la migración y la proliferación en las células de MLV. Los canales TRP y su regulación son por lo tanto de importancia fundamental en la función celular y la enfermedad (Berridge et al., 2003; Song et al., 2011).

**Estructura, función y regulación de los canales TRP**

Las proteínas TRP forman canales de cationes con selectividad variable a diferentes cationes (Oberwinkler et al., 2005). Las proteínas TRP son proteínas transmembrana con seis dominios transmembrana, con un poro delimitado entre el quinto y el sexto dominios transmembrana. Los dominios N- y C-terminales son intracelulares y se cree que están implicados en la regulación de la función y el ensamblaje del canal TRP. Se cree que los canales TRP son homo o hetero-tetrámeros de proteínas TRP con cada subunidad contribuyendo a la selectividad del poro conductor de iones (Clapham et al., 2005).



**Figura XV. Estructura de los canales TRP.**

(A) TRPC, TRPV, TRPM, y TRPP son canales iónicos compuestos de seis dominios transmembrana en la membrana plasmática. El dominio formador de poros (P) se encuentra entre los dominios transmembrana S5 y S6. TRPC1 contiene un dominio de hélice superenrollada y muchas repeticiones de anquirina cerca de su extremo N-terminal. Cerca del dominio C-terminal de TRPC1 hay un dominio de caja TRP, que es una región conservada después del último dominio transmembrana, y un dominio de anclaje de la caveolina (CSD). TRPV1 también contiene varias repeticiones de anquirina. TRPM7 contiene un dominio quinasa cerca de su extremo C-terminal. (B) Los canales TRP funcionales son hetero u homo-tetrámeros formados por diversos monómeros del TRP. Adaptado de Song et al., 2011.

Se ha propuesto que las interacciones alostéricas entre subunidades contribuyen a la unión de los canales TRP; sin embargo, la ubicación y la estructura de estas uniones son desconocidas. Las secuencias de aminoácidos que flanquean las regiones formadoras de poros de proteínas TRP están fuertemente conservadas a través de las diversas familias de canal TRP destacando su importancia en la formación de poros y/o la unión de poros (Nilius et al., 2005).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La función del canal TRP está regulada por cuatro mecanismos básicos: (a) activación del receptor de membrana plasmática, (b) activación del ligando, (c) activación directa, y (d) activación indirecta (Ramsey et al., 2006). El receptor acoplado a proteína G y el receptor de tirosin quinasa actúan a través del DAG (además de la depleción de los depósitos mediada por IP3) para activar los canales TRP en la membrana plasmática (Hisatsune et al., 2004). Además, la activación de los receptores acoplados a proteína G y los receptores de tirosin quinasa también aumenta la síntesis de IP3, que induce la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares y conduce a la entrada SOC a través de los canales TRP en la membrana plasmática (Voets et al., 2001). Los canales TRP que son activadas por DAG se incluyen dentro de los canales ROC, mientras que los canales TRP que se activan por agotamiento de los depósitos mediado por IP3 se incluyen dentro de los canales SOC. La mayor parte de las subunidades de los canales TRP pueden formar tanto ROC como SOC en muchos tipos de células, incluyendo las células de MLV y las células endoteliales (Song et al., 2011).

Varios ligandos pueden activar los canales TRP. La activación por ligando incluye la activación por pequeñas moléculas exógenas como la capsaicina o el 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB); lípidos endógenos como el DAG, eicosanoides, o nucleótidos de purina; iones como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  y el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (Venkatachalam et al., 2002; Zhu, 2006). La actividad del canal TRP puede estimularse también por activación directa, como cambios de temperatura (Clapham, 2003), estimulación mecánica (Maroto et al., 2005) y el acoplamiento conformacional con otras proteínas, como la molécula de interacción estromal 1 (STIM1) o el IP3R. La activación indirecta se refiere al control de la transcripción o la inserción de vesículas que contienen proteínas TRP en la membrana plasmática (Song et al., 2011).

Los canales TRPC1-7 se clasifican en tres categorías en función de la secuencia y las características funcionales (Clapham et al., 2003). TRPC1, 4, y 5 forman un grupo. TRPC1 fue la primera proteína TRP de mamífero descubierta. Está ampliamente expresada en muchos tejidos y se pensó que formaba canales heteroméricos con TRPC4 y TRPC5 (Wes et al., 1995). TRPC4 y TRPC5 se cree que forman canales homoméricos. Cuando se expresan juntos, TRPC1, 4, y 5 forman canales de cationes no selectivos que se activan por señalización  $G_q$  a través de la vía de la PLC  $\beta 1$  (Plant y Schaefer, 2005).

TRPC3, 6 y 7 tienen más o menos un 75% de homología de secuencia y cuando se expresan conjuntamente constituyen canales de cationes de rectificación no selectivos (Ramsey et al., 2006). Estos canales se activan por una vía mediada por receptor con la

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

participación del DAG y se cree que son importantes en el sistema vascular y el músculo liso de las vías aéreas (Hofmann et al., 1999). Los canales formados por TRPC3 o TRPC6 también están regulados por N-glicosilación y  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (Dietrich et al., 2003). El TRPC3 se activa por fosforilación por la PKG (Kwan et al., 2004), mientras que TRPC6 puede ser fosforilada por la familia Src de tirosin quinasas (Vazquez et al., 2004). TRPC2 comparte más o menos un 30% de homología de secuencia con TRPC3/6/7 (Vannier et al., 1999). Sin embargo, TRPC2 es un pseudogen en los seres humanos (Ramsey et al., 2006).

TRPC1 se expresa en el sistema vascular y ha sido vinculada a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  como un ROC y como un SOC. Forma canales heteromultiméricos con TRPC3-5 y TRPP2 en el sistema vascular. Además, TRPC1 puede ser la isoforma clave responsable de la entrada SOC que produce vasoconstricción pulmonar y estimula la proliferación del músculo liso arterial pulmonar (Clapham et al., 2003; Clapham et al., 2005).

TRPC3 y 6 se expresan en tejidos vasculares y se cree que funcionan principalmente como ROC, aunque TRPC6 también puede formar canales heterotetraméricos con otras isoformas del TRP que pueden ser activadas por el vaciado de los depósitos en MLV pulmonar y células endoteliales. TRPC6 se expresa en células de MLV en el sistema vascular pulmonar y sistémico. TRPC4 se expresa predominantemente en el endotelio y es importante en la regulación de la permeabilidad microvascular pulmonar (Jung et al., 2003), la vasodilatación dependiente de agonistas (Hu et al., 2000) y la transcripción de genes (Kwan et al., 2004). TRPC7 se cree que contribuye a la formación del ROC y del SOC (Song et al., 2011).

Los canales TRPC son importantes en la regulación del tono vascular ya que median el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  implicado en la vasoconstricción inducida por agonistas y la proliferación celular del músculo liso mediada por mitógenos. Además, la capacidad de los canales TRPC para alterar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  con un cambio en el potencial de membrana les confiere la capacidad de modular la vasoconstricción y la vasodilatación a través de un mecanismo independiente de la tensión. La vasoconstricción pulmonar inducida por agonistas y por hipoxia se cree que está, al menos en parte, mediada por el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales TRPC1 y TRPC6 (Song et al., 2011).

### 2.3. Entrada de $\text{Ca}^{2+}$ operada por depósito

Las funciones de las células de MLV están reguladas por una amplia variedad de factores de crecimiento y compuestos vasoactivos que actúan a través de la unión a sus receptores específicos en la membrana plasmática. Estos receptores normalmente se unen y activan las isoformas de la PLC, activando la producción de los segundos mensajeros IP3 y DAG con hidrólisis del PIP2. La disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE como resultado de la acción del IP3 en el IP3R activa una entrada ubicua de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática originalmente descrita por Putney (1986) denominada *entrada capacitativa* de  $\text{Ca}^{2+}$  (Trebak et al., 2010).

Poco después, varios trabajos describieron los eventos de señalización subyacentes de la entrada SOC y las propiedades biofísicas del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en sí. Estos canales fueron denominados canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC), con la corriente iónica denominada corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares ( $I_{\text{CRAC}}$ ) (Hoth y Penner, 1992; Zweifach y Lewis, 1993). La identidad molecular de los canales CRAC no se conoció hasta 2006, cuando grupos independientes identificaron la proteína de formación de poros (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006). El primer y mejor caracterizado canal SOC se encuentra en las células hematopoyéticas y lleva a cabo una corriente rectificadora interna, altamente selectiva al  $\text{Ca}^{2+}$ , modulada por voltaje, descrita por primera vez en mastocitos de rata con leucemia basófila (House et al., 2007; Trebak et al., 2010).

La entrada SOC es el fenómeno por el cual el agotamiento de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares abre los canales tipo SOC de la membrana plasmática. Tras el agotamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS/RE, esta deficiencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se detecta y se transmite a los canales de la membrana plasmática para permitir que fluya el  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma, donde a continuación la SERCA lo secuestra al RS/RE, por tanto reponiéndose los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ . La entrada SOC es necesaria para la regulación a largo plazo de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$ ; sin ella, los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS/RE se agotarían cuando las células son estimuladas con ligandos y los receptores de membrana se activan (Song et al., 2011).

### 2.3.1. Mecanismo de la entrada SOC: STIM1 y ORAI

Se ha identificado la proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de interacción con el estroma (STIM1) como el principal sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005), capaz de oligomerizarse y reorganizarse en zonas de unión definidas de la membrana plasmática y el RS tras la depleción de los depósitos, en respuesta a una señal de activación de los canales SOC en la membrana plasmática (Abdullaev et al., 2008). STIM1 es una proteína transmembrana de 685 aminoácidos que se expresa en la membrana del RE y la membrana plasmática. Cerca del extremo N-terminal de STIM1 hay un dominio que detecta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE (que está en el intervalo de 0,5-2 mM). Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  no está vinculado a este dominio, por ejemplo, cuando el depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS/RE se agota, STIM1 sufre un cambio conformacional, que le permite multimerizarse, se transloca a la unión entre la membrana del RS y la membrana plasmática, se une con tetrámeros Orai1 en la membrana plasmática, activa los canales SOC e induce la entrada SOC (Roos et al., 2005; Song et al., 2011).

La proteína de membrana Orai1 es un componente esencial de los canales SOC (Vig et al., 2006; Firth et al., 2007) y una unidad esencial en la formación de poros de los canales SOC. Los mecanismos de acoplamiento STIM1/Orai1 parecen implicar la unión directa de una región altamente conservada de 107 aminoácidos de STIM1 a los extremos N- y C-terminales de Orai1 para abrir el canal CRAC (Muik et al., 2009; Park et al., 2009; Yuan et al., 2009). STIM1 es una proteína transmembrana ubicada principalmente en el RE, pero se puede encontrar de forma limitada en la membrana plasmática ( $\approx 10\%$  de las proteínas totales) (Hewavitharana et al., 2007). En la membrana plasmática, STIM1 está implicada en la activación de la vía de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por araquidonato (Mignen et al., 2007). STIM1 tiene un homólogo estrechamente relacionado, STIM2 (Hewavitharana et al., 2007), que está activa a concentraciones basales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE y puede activar el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de Orai1 con menor disminución en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE, en comparación con STIM1 (Brandman et al., 2007). De hecho, parece estar implicado en el mantenimiento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE en condiciones basales en ausencia de estimulación por agonistas (Brandman et al., 2007).

Se ha demostrado que una mutación en Orai1 se asocia con deficiencia inmune combinada severa en seres humanos. Además, la regulación al alza o a la baja de la entrada SOC puede aumentar o disminuir crónicamente la velocidad y la magnitud de otros mecanismos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y tienen un efecto crónico en la biología celular (Gill et al., 2006; Song et al., 2011).

También se ha descrito la existencia funcional de corrientes CRAC codificadas por STIM1/Orai1 en células de MLV (Potier et al., 2009b), y en células endoteliales (Abdullaev et al., 2008), argumentando que CRAC es un mecanismo general para la entrada SOC en todas las células y poniendo en duda la participación de los canales TRPC como miembros de los canales SOC (Trebak et al., 2010).

Orai1 tiene dos homólogos, Orai2 y Orai3, que exhiben distintas propiedades farmacológicas, biofísicas y de selectividad de iones (DeHaven et al., 2007); el papel de Orai2 y Orai3 en las vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en diferentes tipos de células, incluyendo músculo liso, es desconocido. Estas proteínas también forman canales SOC cuando se coexpresan con STIM1 en células HEK293 (DeHaven et al., 2007). Las distintas isoformas de Orai podrían formar canales homo y hetero-multiméricos compuestos de Orai2 y Orai3 (junto con Orai1) que podrían codificar una clase diferente de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  con mecanismos de activación alternativos, cuya razón de ser es contribuir a la diversidad de las vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en diferentes tipos de células, proporcionando canales específicos adaptados a las necesidades de señalización de las células, mejorando la diversidad de los canales selectivos de  $\text{Ca}^{2+}$  con el fin conseguir una señalización selectiva (Trebak et al., 2010).

El canal selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  regulado por ácido araquidónico (ARC) es un ejemplo de canal altamente selectivo al  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de los depósitos (Shuttleworth, 2009). Los canales ARC están compuestos por heteropentámeros de Orai1 y Orai3 (tres moléculas de Orai1 y dos de Orai3) (Mignen et al., 2008) y están regulados por el *pool* de STIM1 presente en la membrana plasmática (Mignen et al., 2007). El extremo N-terminal de Orai3 parece determinar la selectividad del ácido araquidónico para la activación de los canales ARC (Thompson et al., 2010; Trebak et al., 2010).

### 2.3.2. STIM/Orai y función de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ tipo SOC en el músculo liso

El músculo liso es estructural y funcionalmente diferente tanto del músculo esquelético como del cardíaco, y presenta una amplia heterogeneidad; dependiendo de su localización (árbol vascular, pulmones, vías respiratorias, tracto gastrointestinal y órganos reproductivos, etc) o de su ubicación dentro de un lecho vascular específico, el músculo liso muestra diferencias en la expresión de receptores, proteínas de señalización y canales iónicos. Varios tipos de músculo liso muestran contractilidad rítmica espontánea, pero en general la

contractilidad del músculo liso es fundamentalmente diferente de músculo esquelético y cardíaco (Trebak, 2012).

### **STIM/Orai y contractilidad del músculo liso**

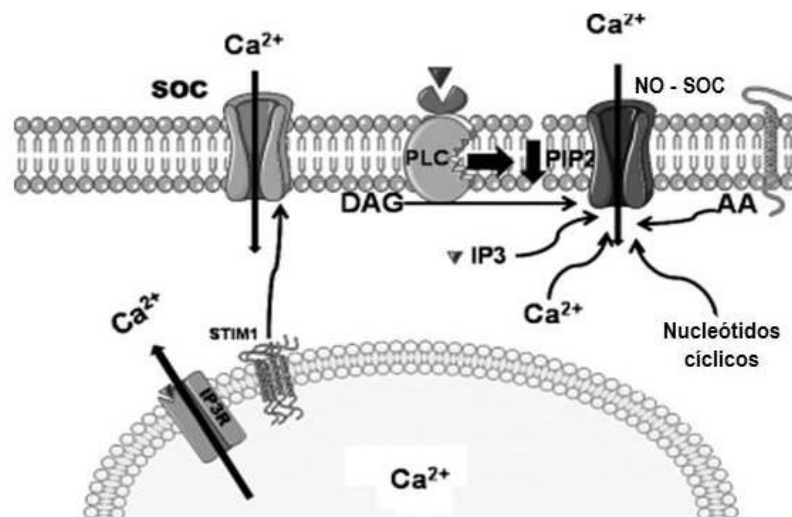
Las células de MLV están parcialmente contraídas en reposo y su aumento de la contractilidad, normalmente en respuesta a factores neuronales, humorales y endoteliales que actúan sobre los receptores de membrana, se desarrolla de forma relativamente lenta y en algunos casos puede ser sostenida y tónica. La entrada SOC no parece desempeñar un papel significativo en la contractilidad del músculo liso o cardíaco. En contraste, la contractilidad del músculo esquelético parece depender de la entrada SOC, aunque el mecanismo por el cual la entrada SOC hace tal contribución sigue siendo controvertido. En línea con estas diferencias, el músculo esquelético muestra niveles más altos de expresión de STIM1 y Orai1 en comparación con el músculo cardíaco (Vig et al., 2008; Kiviluoto et al., 2011). Los cardiomiocitos adultos y el músculo liso contráctil parecen expresar niveles casi indetectables de STIM1 y Orai1 (Berra-Romani et al., 2008; Bisailon et al., 2010; Luo et al., 2012; Trebak, 2012).

### **STIM/Orai y remodelado del músculo liso**

Existe amplia evidencia que sugiere que la señalización STIM/Orai podría ser más relevante durante los cambios de adaptación a largo plazo, que se producen durante los procesos de remodelado del MLV fisiológicos o patológicos, donde la activación de la vía SOC a través de receptores acoplados a proteína G, mediando el agotamiento de los depósitos de  $Ca^{2+}$  a través de receptores IP3, conduce a la posterior activación de transcripción de genes. Se ha establecido que los SOC no son sólo importantes para la reposición de los almacenes internos de  $Ca^{2+}$ , sino que también son esenciales para la conducción de los programas de la transcripción en el núcleo (Trebak, 2012).

A diferencia del músculo esquelético o cardíaco, las células del músculo liso conservan la capacidad de diferenciación, tal vez como un rasgo adquirido evolutivamente, necesario para la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas. Mientras que el músculo esquelético y cardíaco se someterán a hipertrofia en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos, las células de MLV irán un paso más allá, proliferando y migrando (House et al., 2008). Este proceso de remodelado del músculo liso, que es central en diversas enfermedades vasculares y respiratorias, se caracteriza por la pérdida de proteínas contráctiles, la adquisición de

proteínas pro-proliferativas y pro-migratorias y el remodelado de los receptores de membrana plasmática y la expresión de canales iónicos (House et al., 2008; Beech, 2012). Durante el remodelado de las células de MLV, éstas adquieren un repertorio de canales de iones y un fenotipo estructural que recuerda más a las células no excitables (House et al., 2008). Mientras las células de MLV contráctiles en reposo apenas muestran cualquier expresión de STIM1 y Orai1, los niveles de STIM1 y Orai1 y la actividad de los SOC se incrementan en las células de MLV proliferativas en comparación con células contráctiles aisladas del mismo lecho vascular (Berra-Romani et al., 2008; Potier et al., 2009b; Bisailon et al., 2010). STIM1 y Orai1 median las  $I_{CRAC}$  en células musculares lisas proliferativas y son importantes para su proliferación y la migración *in vitro* (Potier et al., 2009b; Bisailon et al., 2010). Es de destacar que los niveles de proteínas STIM1/Orai1 y  $I_{CRAC}$  en células de MLV cultivadas o células endoteliales son de 4 a 5 veces menores que los de los linfocitos o células cebadas (Abdullaev et al., 2008; Potier et al., 2009b; Trebak, 2012).



**Fig XVI. Receptores de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes e independientes de los depósitos.** La unión de un agonista a los receptores acoplados a la PLC viene seguido por la hidrólisis del PIP2 en dos segundos mensajeros: IP3 y DAG. La unión de IP3 al IP3R en el RS provoca el agotamiento de los depósitos del RS seguido por la agregación de STIM1 en estructuras puntiformes cerca de la membrana plasmática, donde se une a los canales Orai1 y provoca su activación. Este modo de señalización de  $Ca^{2+}$  que depende del estado de llenado del almacén del RS se llama dependiente de los depósitos y los canales se conocen como SOC. Existen vías de entrada de  $Ca^{2+}$  que no dependen del agotamiento de los depósitos, y se activan tras la estimulación de receptores acoplados a PLC. Estas rutas pueden ser activadas por segundos mensajeros como DAG, IP3, ácido araquidónico,  $Ca^{2+}$ , nucleótidos cíclicos, e hidrólisis del PIP2 y se conocen como canales ROC. Adaptado de Trebak et al., 2010.

STIM1 regula la función de un elevado número de canales y transportadores; todos los canales Orai (DeHaven et al., 2007), canales selectivos de  $Ca^{2+}$  regulados por ácido araquidónico (Mignen et al., 2007), canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (Park et al., 2010; Wang et al., 2010),

canales TRPC (Yuan et al., 2007) y la PMCA (Ritchie et al., 2012) están reguladas por STIM1. Del mismo modo, Orai1 podría desempeñar funciones que son independientes de sus propiedades conductoras de  $\text{Ca}^{2+}$  o podrían constituir subunidades de canales que están regulados de manera independiente de STIM1. De hecho, Orai2 y Orai3 también están regulados al alza durante el remodelado del músculo liso (Berra-Romani et al., 2008), junto con las isoformas TRPC1 y TRPC6 (Yu et al., 2004; Kumar et al., 2006). La regulación al alza del canal TRPC se ha demostrado que contribuye al remodelado cardíaco patológico en ratones (Eder y Molkentin, 2011). Además, no todas las funciones de STIM1 y Orai1 están mediadas necesariamente a través de la actividad SOC. Como se señaló anteriormente, las isoformas STIM y Orai pueden contribuir a la formación de canales independientes de depósitos, como los canales selectivos de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por ácido araquidónico. Estos canales independientes de depósitos crearían una diversa gama de microdominios de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  generados a través de mecanismos de activación alternativos para ajustar la especificidad de señalización en respuesta a diversos factores de crecimiento y agonistas (Trebak, 2012).

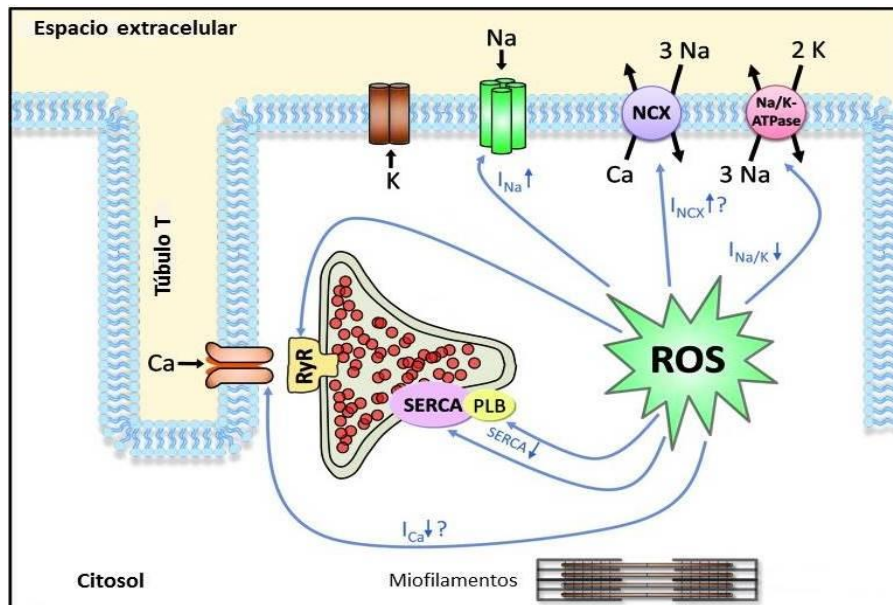
### **Modulación del canal de $\text{Ca}^{2+}$ y fenotipos de células de MLV**

En respuesta a diversos estímulos ambientales, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas, influencias mecánicas y mediadores inflamatorios, las células de MLV quiescentes son sometidas a cambios transcripcionales que afectan tanto a la regulación a la baja de proteínas contráctiles como a la regulación positiva de las proteínas que conforman un fenotipo proliferativo (Wamhoff et al., 2006; House et al., 2008). Se cree que esta plasticidad ha evolucionado como un mecanismo de reparación vascular durante la lesión y/o adaptación vascular a las demandas crecientes permitiendo a las células de MLV cambiar hacia un fenotipo no contráctil, proliferativo y migratorio. Este cambio fenotípico puede, bajo ciertas circunstancias, contribuir al desarrollo de enfermedad vascular (Chamley-Campbell et al., 1979; Schwartz et al., 1986). El cambio fenotípico de las células de MLV está relacionado con la regulación a la baja de los canales VOC tipo L y el aumento en la expresión de TRPC1 y TRPC6 (Bergdahl et al., 2005). La expresión de TRPC1 está regulada al alza después de una lesión vascular, y se asocia con la conversión de las células musculares lisas de un fenotipo quiescente a proliferativo, iniciando la formación neointimal. Cuando la función de TRPC1 fue bloqueada con anticuerpos anti-TRPC1, el crecimiento de la neointima en cultivo de órganos y la proliferación de las células del MLV se inhibieron significativamente (Kumar et al., 2006). Berra-Romani y colaboradores (2008) mostraron que los niveles de STIM1 y todas las

isoformas Orai se incrementan dramáticamente en células de MLV proliferativas de arteria mesentérica de rata, lo que sugiere un papel de estas proteínas en el manejo alterado del  $\text{Ca}^{2+}$  durante el remodelado vascular. También se ha demostrado un incremento similar de los niveles de STIM1/Orai1 y entrada SOC en células de MLV aórticas proliferativas y migratorias de rata (Potier et al., 2009b). Todos estos estudios proporcionan evidencia de que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes e independientes de depósitos contribuyen a la enfermedad vascular mediante el control de la proliferación y la migración de las células de MLV durante la modulación fenotípica (Trebak et al., 2010).

#### 2.4. Señalización de $\text{Ca}^{2+}$ a través de especies reactivas de $\text{O}_2$

Aunque se sabe relativamente poco sobre el papel de las ROS y las RNS en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  de las células de MLV, se cree que en una gran variedad de tipos celulares las ROS/RNS inhiben las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  y activan de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y canales de entrada aumentando así la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico total (Touyz, 2005; Hidalgo y Donoso, 2008).



**Figura XVII.** Resumen de los efectos de las ROS por oxidación directa de las proteínas de acoplamiento excitación-contracción. Adaptado de Wagner et al., 2013.

Está bien establecido que la acumulación de ROS conduce a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Viste et al., 2005; Song et al., 2006; Wagner et al., 2011). También se ha descrito la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  inducida por ROS (Viste et al., 2005). En cardiomiocitos defectuosos se ha demostrado que la sobrecarga de  $\text{Na}^+$  citosólica mejora en gran medida la producción de ROS mitocondrial (Kohlhaas et al., 2010). Esto daría lugar a un bucle de retroalimentación positiva que podría aumentar en gran medida la lesión inducida por las ROS. Debido a que la homeostasis intracelular de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  están estrechamente relacionadas entre sí, los cambios en las proteínas de manejo de  $\text{Na}^+$ , con los consiguientes cambios en la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , pueden tener un profundo impacto en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la contractilidad (Wagner et al., 2013).

#### 2.4.1. Bombas de $\text{Ca}^{2+}$ del RS y de la membrana plasmática

A través de la hidrólisis del ATP, la SERCA y la PMCA reducen activamente los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma y por tanto juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. La SERCA secuestra  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma al RS en muchos tipos de células, incluyendo el MLV y las células endoteliales. Las células del MLV quiescentes expresan dos variantes del gen SERCA2, 2a y 2b, y múltiples isoformas de PMCA1 y 4 (Abramowitz et al., 2000; Tiwari et al., 2006; House et al., 2008).

El papel de las ROS y las RNS en la modulación de la actividad de la SERCA sigue siendo controvertido. Las distintas isoformas SERCA contienen entre 22 y 28 residuos de cisteína, y se cree actualmente que el estado redox de estos residuos es crucial para la función de la SERCA. De hecho, en arterias ateroscleróticas, las ROS intracelulares se incrementan y hasta 9 residuos de cisteína de la SERCA se sulfonilan de forma irreversible (Adachi et al., 2004; Song et al., 2011).

Se ha demostrado que las ROS y las RNS inhiben la SERCA *in vitro* mediante la modificación de grupos sulfhidrilo de los residuos cisteína en varios tipos de células (Hidalgo y Donoso, 2008). El tratamiento de las arterias coronarias desprovistas de endotelio con  $\text{ONOO}^-$  conduce a la inhibición de la respuesta contráctil a la Ang II o a inhibidores de la bomba SERCA (Grover et al., 2003a; Grover, et al., 2003b). El tratamiento de vesículas del RS con donantes de NO y  $\text{ONOO}^-$  induce la S-nitrosilación de residuos cisteína de la SERCA (Hidalgo y Donoso, 2008). Sin embargo, también se ha descrito que la activación de la SERCA mediada por NO en

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

células de MLV incrementa la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el SR, inhibiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por almacén y produciendo por tanto vasodilatación (Trepakova et al., 1999; Adachi et al., 2004; Tong et al., 2010). Una explicación para esta aparente discrepancia podría ser que pequeñas concentraciones de ROS/RNS son estimuladoras mientras que las concentraciones elevadas producen inhibición. Del mismo modo, la PMCA es inhibida reversiblemente por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el  $\cdot\text{O}_2^-$ , el  $\cdot\text{OH}$ , y el  $\text{ONOO}^-$  (Hidalgo y Donoso, 2008; Trebak et al., 2010).

La SERCA2a y su proteína reguladora (inhibidora) fosfolamban, son sustrato de modificaciones redox. La SERCA2a contiene 25 residuos cisteína, de los cuales sólo 1 ó 2 son esenciales para la acción de la enzima (Murphy, 1976). Los agentes tiol-oxidantes o las ROS son capaces de inhibir la función de la SERCA (Morris y Sulakhe, 1997; Xu et al., 1997). Parte de este efecto puede ser resultado de la interferencia directa con el sitio de unión a ATP (Xu et al., 1997). Además, el fosfolamban puede ser fosforilado por la proteína quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina dependiente II (CaMKII) y la PKA, produciendo su disociación y la activación de la SERCA (Maier y Bers, 2007). Este último efecto, sin embargo, parece ser menos relevante para la regulación dependiente de ROS de la SERCA (Wagner et al., 2013).

En contraste con la activación de la SERCA por CaMKII y PKA, la PKC reduce su actividad. Los corazones de ratones deficientes en PKC son hipercontráctiles, mientras que los de ratones transgénicos que expresan un exceso de PKC son hipocontráctiles. El mecanismo subyacente implica la fosforilación dependiente de la PKC del inhibidor de la proteína fosfatasa-1, produciendo la defosforilación del fosfolamban. La actividad reducida de la SERCA2a conduce a una reducción del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS (Braz et al., 2004; Wagner et al., 2013).

La PMCA y la CaM en el citoplasma están reguladas por el estado redox. Las ROS inactivan la PMCA, lo que conduce a un menor bombeo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma al espacio extracelular y un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma. La CaM, que también está regulada por la modificación oxidativa, se une a la PMCA e induce la disociación del dominio autoinhibidor desde el sitio activo de la enzima y aumenta varias veces la tasa de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  de la PMCA. Las ROS pueden oxidar los residuos de metionina 144 y 145 de la CaM, lo que puede conducir a la inhibición de la PMCA y el aumento de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (Akar et al., 2005; Baartscheer et al., 2005; Song et al., 2011).

#### 2.4.2. Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPasa del sarcolema

Fisiológicamente, el Na<sup>+</sup> intracelular está fuertemente controlado por la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa. El modelado computacional de los miocitos ventriculares de conejo expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reveló que incluso un aumento 16 veces mayor en la conductancia de la corriente de Na<sup>+</sup> inducida por ROS no produce un aumento en el Na<sup>+</sup> intracelular debido a la activación dramática de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa (Wagner et al., 2011). Por tanto, es necesaria una inhibición sustancial de la actividad de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa para explicar el aumento en el Na<sup>+</sup> intracelular inducido por ROS. Curiosamente, se ha demostrado que las ROS inhiben la función de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa de forma potente, aunque no se conoce el mecanismo subyacente (Kukreja et al., 1990; Shattock y Matsuura, 1993). Además de cambios en el entorno lipídico, se ha sugerido la oxidación directa de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa. A este respecto es interesante que la subunidad β de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPasa contiene un grupo sulfhidrilo esencial para la actividad catalítica (Wagner et al., 2013).

#### 2.4.3. Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> del sarcolema

El Na<sup>+</sup> intracelular está estrechamente asociado con el Ca<sup>2+</sup> intracelular. La actividad del NCX cardíaco es esencial para el potencial de membrana y los gradientes de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> a través del sarcolema. Bajo una prolongada duración del potencial de acción e incremento del Na<sup>+</sup> intracelular, el flujo de salida de Ca<sup>2+</sup> reducido (modo de avance) y/o la afluencia de Ca<sup>2+</sup> (modo inverso) a través del NCX contribuye a la acumulación de Ca<sup>2+</sup> intracelular. De hecho, el modelado computacional reveló que la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través del NCX se ve favorecida drásticamente en condiciones de aumento intracelular de Na<sup>+</sup> (Wagner et al., 2011; Wagner et al., 2013).

Las ROS pueden activar el NCX (Goldhaber, 1996; Santacruz-Tolosa et al., 2000), pero el efecto descrito es variable dependiendo de la fuente de ROS y el nivel de ROS. Se ha demostrado que para el NCX cardíaco, los enlaces disulfuro intramoleculares entre residuos de cisteína de diferentes dominios son funcionalmente relevantes (Reeves et al., 1986). Existe controversia sobre el papel que desempeñan las serina/treonina quinazas en la regulación de NCX. No se ha demostrado ningún cambio funcional en el NCX cardíaco con la aplicación de las subunidades catalíticas de la PKA y PKC (Hilgemann et al., 1991), lo que sugiere que el NCX no es regulado a través de quinazas. Sin embargo, se ha demostrado que el bucle intracelular de NCX puede ser fosforilado por PKA o PKC, lo que puede aumentar la actividad del NCX y puede ser responsable de parte de la activación inducida por ROS (Iwamoto et al., 1996; Wagner et al., 2013).

En condiciones de aumento de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , la estimulación del NCX dependiente de ROS puede producir una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . De hecho, se ha demostrado que el aumento de expresión de NCX, como se observa en situación de fallo cardiaco, aumenta la lesión celular inducida por las ROS (Viste et al., 2005), y que la inhibición farmacológica de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  vía NCX reduce la sobrecarga de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por las ROS y disminuye la lesión celular (Wagner et al., 2011; Wagner et al., 2013).

#### 2.4.4. Canales de liberación de $\text{Ca}^{2+}$ en el RS/RE: IP3R y RyR

La activación de los IP3R y RyR en la membrana del RS/RE permite la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS/RE al citosol a través de canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y, tras la estimulación o activación de receptores en la membrana plasmática, conducir a un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica y vasoconstricción. De acuerdo con la tendencia de las ROS de elevar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , las ROS estimulan la actividad de los IP3R y RyR (Song et al., 2011).

Varios estudios han descrito la estimulación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el IP3R desde los depósitos intracelulares en respuesta a las ROS (Hidalgo y Donoso, 2008). Los niveles fisiológicos de ROS celulares producidos a través de las NADPH oxidasas asociadas a la membrana podría aumentar la sensibilidad del IP3R al IP3 (Hu et al., 2000; Trebak et al., 2010). La oxidación de los grupos tiol por agentes redox endógenos, como  $\cdot\text{O}_2^-$  y GSSH, promueven la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por IP3R en diferentes tipos de células (Bootman et al., 1992; Suzuki y Ford, 1992). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno podría aumentar la sensibilidad del IP3R al IP3, lo que demuestra la relevancia fisiológica de los efectos de las ROS en la actividad del IP3R en células endoteliales aórticas humanas (Hu et al., 2000; Song et al., 2011)

Las ROS modifican la actividad del RyR a través de residuos tiol de cisteína hiperreactivas (Pessah et al., 2002; Hidalgo y Donoso, 2008). El músculo esquelético contiene principalmente la isoforma RyR1, el músculo cardiaco la isoforma RyR2, y el cerebro y el músculo liso, la isoforma RyR3, aunque pequeñas cantidades de las otros dos isoformas se expresan también en las células de MLV (Song et al., 2011).

El RyR2 (isoforma cardiaca) es un gran complejo tetramérico que contiene hasta 89 residuos de cisteína por monómero, de los cuales aproximadamente 21 están libres (Xu et al., 1998). Este receptor puede ser modificado por compuestos que afectan a grupos sulfidriilo,

afectando a la función de los canales (Xi et al., 2005; Hidalgo y Donoso, 2008). Las isoformas del RyR pueden ser activadas por S-nitrosilación (Xu et al., 1998; Sun et al., 2001). La adición exógena de compuestos redox, así como la producción endógena de ROS y RNS modifican el RyR en residuos de cisteína y producen su activación. La evidencia experimental en el músculo esquelético sugiere que la Cys3635 está involucrada en la detección redox del RyR; la modificación de este residuo produce la activación del RyR y protección de la inhibición mediada por la unión a calmodulina en presencia de concentraciones altas de  $\text{Ca}^{2+}$  (Moore et al., 1999; Zhang et al., 1999). Además, la S-nitrosilación de Cys3635 que contiene el dominio de unión a CaM es responsable de la activación de RyR mediada por NO a tensiones de  $\text{O}_2$  fisiológicamente relevantes (Sun et al., 2001).

Los agentes capaces de oxidar grupos tiol, como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  activan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RyR tras la oxidación de más de 7 tioles por subunidad (Boraso y Williams, 1994; Favero et al., 1995; Zissimopoulos et al., 2007). Dado que el RyR tiene múltiples sitios para la regulación por fosforilación y/o la interacción con  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP, CaM, o proteínas reguladoras, la oxidación puede interferir con estos reguladores. De hecho, el mecanismo de aumento de ROS inducida en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RyR implica un cambio en la sensibilidad del RyR al  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP citosólicos (Eager y Dulhunty, 1998; Marengo et al., 1998). Para que se produzca la activación se requiere la oxidación de más de 7 tioles por subunidad (Xu et al., 1998). En contraste, la oxidación de menos de 5,5 tioles por subunidad se produce fácilmente sin afectar la función del RyR (Xu et al., 1998). Por lo tanto, la calidad de la regulación del RyR dependiente de ROS está estrechamente relacionada con la cantidad de tioles oxidados (Wagner et al., 2013).

Además de la oxidación directa de los residuos de cisteína, las ROS pueden aumentar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RyR través de la activación de la serin/treonin quinasas (Sag et al., 2011). Es bien sabido que la CaMKII y la PKA fosforilan el RyR incrementando la fuga diastólica de  $\text{Ca}^{2+}$  (Maier y Bers, 2007). Ambas quinasas pueden ser oxidadas y activadas por ROS (Eager y Dulhunty, 1998; Brennan et al., 2006). Por lo tanto, es plausible que una parte de los efectos de las ROS sobre el RyR estén mediados a través de la CaMKII oxidada o la PKA oxidada (Wagner et al., 2013).

#### 2.4.5. Canales de entrada de Ca<sup>2+</sup> en la membrana plasmática

##### **Canales VOC y ROS**

Debido a que tanto la señalización redox como la de Ca<sup>2+</sup> desempeñan un papel importante en el sistema cardiovascular, donde los canales VOC se expresan ampliamente, fueron unos de los primeros canales de Ca<sup>2+</sup> en ser identificados como sensibles al estado redox.

En varios estudios se han encontrado una gran variedad de oxidantes que regulan la actividad de los canales VOC en diferentes niveles, afectando su expresión, el tiempo de apertura y la probabilidad de apertura. Algunos de estos estudios podrían demostrar que las cisteínas reactivas en la subunidad formadora de poros  $\alpha 1$  son las dianas moleculares para las ROS (Yamaoka et al., 2000). La regulación redox de los canales VOC ha sido estudiado en miocitos y neuronas de varias especies, así como en sistemas de expresión heterólogos (Yamaoka et al., 2000; Viola et al., 2007). De forma similar en cuanto a lo descrito sobre la regulación redox de Orai así como para algunos TRPC, algunos autores describen la activación de los canales VOC por oxidación mientras que otros han descrito lo contrario, es decir, la inhibición de la actividad de los canales (Peers et al., 2005; Scragg et al., 2008). Estas diferencias pueden depender del tipo de célula y la modulación genética (canales endógenos o un sobreexpresión del sistema), pero también apuntan hacia una compleja regulación redox de señalización de Ca<sup>2+</sup> en el sistema cardiovascular y nervioso, donde la oxidación de dianas adicionales podría influir en la función de los canales VOC (Bogeski et al., 2011).

Los canales VOC en la membrana plasmática se ven afectados por los compuestos redox exógenos y endógenos (Hool y Corry, 2007). Sin embargo, existe controversia sobre el efecto de la oxidación en la actividad de los canales VOC tipo L. Mientras que diversos estudios han demostrado que la oxidación aumenta la actividad de los canales VOC, otros han descrito la inhibición de la actividad de estos canales por los agentes oxidantes (Hidalgo y Donoso, 2008). Estas diferencias podrían explicarse por las concentraciones de ROS o RNS involucradas. Un estudio en miocitos ventriculares aislados de cobaya demostró que la oxidación de los grupos tiol en los canales VOC tipo L inhibe la entrada de Ca<sup>2+</sup> (Lacampagne et al., 1995). En contraste con estos resultados, sin embargo, los agentes reductores de tiol disminuyeron las corrientes basales de Ca<sup>2+</sup> tipo L en miocitos ventriculares y los agentes oxidantes aumentaron estas corrientes de forma independiente de AMPc y proteína G, lo que sugiere la participación

de grupos tiol (Yamaoka et al., 2000). Asimismo, la exposición transitoria de los miocitos cardíacos a  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta la actividad basal del canal de tipo L (Viola et al., 2007; Song et al., 2011).

Además de sus efectos sobre los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , las ROS como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\cdot\text{O}_2^-$  pueden estimular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales VOC tipo T en células de MLV (Tabet et al., 2004). También se ha descrito que las ROS producen un aumento en la actividad del canal de tipo L (Hudasek et al., 2004), y la participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L activados por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  derivado de la mitocondria (Viola et al., 2007). En el músculo liso y los miocitos cardíacos, el NO parece tener un efecto inhibitor en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L a través de S-nitrosilación (Campbell et al., 1996; Poteser et al., 2001). Hool (2000) describió que la hipoxia en miocitos cardiacos puede inhibir la corriente basal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y aumenta la sensibilidad de esta corriente a la estimulación de receptor  $\beta$ -adrenérgico. Los efectos de la hipoxia podrían ser imitados por la disminución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  celular con catalasa, apuntando a favor de la implicación de las ROS en la sensibilización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Hool y Arthur, 2002). Sin embargo, Hudasek y colaboradores (2004) demostraron que la producción endógena de  $\text{H}_2\text{O}_2$  participa en la activación canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, pero no lograron detectar un efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de la NADPH oxidasa en la regulación dependiente de hipoxia de estos canales (Trebak et al., 2010).

La subunidad de formación de poros  $\alpha_{1c}$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L cardiaca contiene más de 10 residuos de cisteína (Mikami et al., 1989), que potencialmente pueden someterse a modificación redox. Se ha demostrado que los agentes oxidantes de grupos tiol o las ROS disminuyen irreversiblemente la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Gill et al., 1995; Lacampagne et al., 1995); sin embargo, también se ha demostrado que pueden aumentarla (Campbell et al., 1996; Song et al., 2010). Parte de la discrepancia puede ser el resultado del hecho de que la CaMKII (Grueter et al., 2006; Blaich et al., 2010), la PKA (Catterall, 2000), y la PKC (Yang et al., 2005) pueden activar la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  por fosforilación, y las tres quinasas están sujetas a la oxidación/activación dependiente de ROS (Yang et al., 2005; Yang et al., 2009).

Por tanto, las ROS pueden inducir simultáneamente la activación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  (vía serin quinasas) y la inhibición de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  (a través de la oxidación directa de la cisteína). El resultado neto depende de las fuentes y los niveles de ROS generados (Wagner et al., 2013).

**Canales TRPC y ROS**

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede inducir movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso de la arteria pulmonar a través de múltiples vías que implican a la liberación de los depósitos internos y la entrada desde el exterior (Lin et al., 2007). La participación de las ROS en la modulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  independientes de voltaje, como los canales SOC o ROC, sigue siendo escasa. Se ha descrito que los canales de cationes TRPC4 y TRPC3 forman canales iónicos redox sensibles que pueden ser activados por la aplicación exógena de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Balzer et al., 1999; Groschner et al., 2004). Todavía se desconoce si las ROS modifican directamente los canales TRPC, pero se ha propuesto la activación redox de TRPC3 a través de fosforilación de la tirosina inducida por ROS y la activación de la PLC (Groschner et al., 2004). Más recientemente se demostró la existencia de canales heteroméricos TRPC3/TRPC4 redox sensibles en células endoteliales (Poteser et al., 2006). La nitrosilación mediada por NO de residuos de cisteína produce la activación de varios miembros de la familia TRP: TRPC1, TRPC4, TRPC5, TRPV1, TRPV3, y TRPV4 (Yoshida et al., 2006). En TRPC5, la Cys553 es nitrosilada en respuesta a la estimulación de receptores acoplados a proteína G, induciendo la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en células endoteliales (Yoshida et al., 2006).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  parece inducir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la activación del canal TRPM2 (Hara et al., 2002). Yamamoto y colaboradores (2008) mostraron que la activación de TRPM2 controla la producción de quimiocinas inducida por ROS en monocitos. El flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de TRPM2 es esencial para la subsiguiente señalización intracelular y la producción de IL-8. Otro canal TRP, el TRPA1, es activado por compuestos reactivos de tiol de estructura diversa a través de la modificación covalente reversible de los residuos de cisteína dentro del N terminal citoplasmático del canal (Trevisani et al., 2007). Los canales TRPA1 son activados por el hipoclorito y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las neuronas sensoriales primarias de las vías respiratorias, lo que sugiere que el TRAP1 actúa como un sensor oxidante en la vía aérea (Bessac et al., 2008). También se ha demostrado la participación de TRPA1 en la mediación de la inflamación de las vías respiratorias y la hiperreactividad en el asma (Caceres et al., 2009; Trebak et al., 2010).

**Efecto de las ROS sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  SOC y las proteínas STIM y Orai**

La modificación redox de cualquiera de los componentes Stim/Orai puede en última instancia resultar en alteraciones en la entrada SOC. Por otra parte, la modulación inducida por

STIM1 de la actividad de los TRPC o los canales VOC (Park et al., 2010; Wang et al., 2010) puede complicar aún más el análisis de los efectos mediados por ROS. También deben tenerse en cuenta los efectos indirectos, como la activación de canales de cationes mediada por ROS que despolarizan la membrana plasmática y por tanto conducen a la modulación indirecta de la actividad del canal CRAC reduciendo la fuerza motriz para el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  o la influencia de la fosforilación alterada de las proteínas que participan en la entrada SOC. La actividad de las PMCA también se ven afectada por la oxidación, aunque a mayores concentraciones de oxidantes y también dependiendo del tipo de célula (Waring, 2005).

Los primeros indicios de que los procesos redox podrían afectar la entrada SOC se describieron cuando los agentes modificadores de grupos tiol, como el timerosal, se mostraron capaces no sólo de sensibilizar el IP3R sino también de inducir la  $I_{\text{CRAC}}$  de forma independiente de IP3 (Poitras et al., 1993; Parekh y Penner, 1995). Estos hallazgos fueron seguidos por varios estudios que conducen a la conclusión de que la oxidación de los IP3R y RyR inducen su activación y así llevan al agotamiento de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Zima y Blatter, 2006; Hidalgo y Donoso, 2008). Por otro lado, hay pocos estudios que describen la regulación redox de la entrada SOC independientemente de IP3R o RyR. Törnquist y colaboradores (1999) confirmaron que la entrada SOC es inhibida por agentes oxidantes modificadores de grupos tiol como el timerosal o el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (300  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, sus resultados sugieren que estos efectos están mediados por la activación de la PKC. El vanadato y su derivado pervanadato obtenido a partir de una reacción química con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son agentes modificadores de tiol y están implicados en la modulación de la entrada SOC. Sin embargo, estos compuestos son también inhibidores muy potentes de la fosfatasa y oxidantes y por lo tanto podrían regular la entrada SOC a través del aumento de la fosforilación. De hecho, varios estudios mostraron que el mantenimiento de la entrada SOC puede ser modulada por cambios redox inducidos en la fosforilación (Walder et al., 2002; Rosado et al., 2004). Redondo y colaboradores (2004a) observaron la activación modesta de la entrada SOC después del tratamiento con bajas concentraciones (micromolares) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mientras que las concentraciones más altas (milimolares) inhibieron la entrada SOC en plaquetas humanas. Además, Suzuki y colaboradores (2009) observaron que el  $\cdot\text{O}_2^-$  activa la entrada SOC pero es suprimida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en mastocitos.

Sin embargo, el mecanismo molecular subyacente a los diferentes efectos de la oxidación y la modificación tiol en la entrada SOC permanece relativamente desconocido. Una de las principales razones para ello es la identidad molecular desconocida de los canales CRAC.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Recientemente, se ha demostrado que la activación de Orai1, pero no la de Orai3 es inhibida por la preincubación con  $H_2O_2$  (Bogeski et al., 2010). La cisteína 195 que está presente en Orai1 pero ausente en Orai3 ha sido identificada como un sensor redox principal de Orai1, aunque las Cys 126 y Cys 143 también contribuyen a la sensibilidad redox. La mutación de las tres cisteínas en Orai1 hacen los canales funcionales pero completamente insensibles a la preincubación con  $H_2O_2$ , proporcionando evidencia de que en un sistema de expresión heterólogo, la preincubación extracelular con  $H_2O_2$  media sus efectos sobre el canal CRAC únicamente a través de la oxidación de Orai1. El aumento de expresión de la insensible Orai3 permite a las células T efectoras reducir la sensibilidad de la entrada SOC hacia el  $H_2O_2$  extracelular (Bogeski et al., 2011).

Grupe y colaboradores (2010) describieron en diversas líneas celulares que el  $H_2O_2$  media directamente el agotamiento de los depósitos y de ese modo activa Orai de forma dependiente de STIM1. Estudios recientes investigaron la influencia de la estequiometría STIM1:Orai (Li et al., 2011), lo que implica que diferentes proporciones de STIM: Orai pueden mostrar diferencias en su comportamiento regulatorio. También es importante averiguar exactamente en qué condiciones las cisteínas en STIM1 y/o STIM2 están oxidadas o reducidas y qué tipo de modificaciones químicas experimentan (por ejemplo nitrosilación o glutationilación). Además, STIM puede activar otros canales (por ejemplo TRPC) que conducen a un aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular, aunque su relación corriente- voltaje debe diferir de aquellas mediadas por Orai.

Otra posible explicación de los resultados divergentes podría ser que los oxidantes autocrinos, producidos intracelularmente pueden favorecer el agotamiento de los depósitos de  $Ca^{2+}$  del RE y la oligomerización de STIM conduce a la activación de los canales CRAC, mientras que la producción extracelular paracrina de ROS tendría como diana principal los canales Orai1 (C195) y por lo tanto inhibiría su activación (Bogeski et al., 2011).



## **II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las ROS, incluyendo el  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , son moléculas que actúan como segundos mensajeros y están implicadas en múltiples vías de señalización dentro de la pared vascular, tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. Diversas funciones celulares como el crecimiento y la diferenciación celular, el tono vasomotor, o la producción de la matriz extracelular, están reguladas por las ROS (Griendling et al., 2000; Paravicini y Touyz, 2008). En condiciones patológicas, las ROS están implicadas en procesos de inflamación, proliferación, migración y activación celular, deposición de la matriz extracelular, fibrosis y angiogénesis, siendo factores importantes en el desarrollo de disfunción endotelial y remodelado vascular en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes o el fallo cardiaco (Paravicini y Touyz, 2008).

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es probablemente la ROS con mayor implicación en la señalización dentro del sistema vascular, debido a que es inherentemente más estable que otras ROS. Se ha descrito que esta molécula puede actuar tanto como vasoconstrictor como vasodilatador (Ardanaz y Pagano, 2006), efectos vasoactivos opuestos que parecen depender del lecho vascular, la polarización de la membrana y de la actividad funcional de los canales de  $\text{K}^+$  (Lucchesi et al., 2005; Ardanaz et al., 2007; Thakali et al., 2007), de la situación patológica (Rodríguez-Martínez et al., 1998; Gao y Lee, 2001; García-Redondo et al., 2009) y del estado redox de la pared arterial (Puri et al., 2013).

Se ha demostrado que las ROS están críticamente involucradas en la regulación fisiológica del flujo sanguíneo coronario. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  desempeña un papel importante como EDHF endógeno en microvasos coronarios, participando junto con el NO y la adenosina en la autorregulación coronaria (Yada et al., 2003) y siendo liberado por el *shear stress* en la dilatación mediada por flujo de las arteriolas coronarias (Miura et al., 2003). Además, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  está implicado en la vasodilatación coronaria metabólica inducida por la estimulación del marcapasos cardiaco (Yada et al., 2007). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  derivado del  $\cdot\text{O}_2^-$  producido por el metabolismo cardíaco induce dilatación de los vasos coronarios para acoplar el flujo sanguíneo coronario al consumo de  $\text{O}_2$  miocárdico (Saitoh et al., 2006). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un mediador endógeno de la respuesta EDH y produce relajación de los microvasos coronarios (Matoba et al., 2003; Shimokawa, 2010) a través de la activación de canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{2+}$  (Barlow y White, 1998; Miura et al., 2003) y de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa (Wong et al., 2014).

Está bien establecido el papel de las ROS como moléculas de señalización intracelular en la regulación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de los diferentes tipos de células, incluidas las células del MLV y

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

las células endoteliales (Trebak et al., 2010; Bogeski et al., 2011). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otras ROS pueden inducir la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los depósitos mediante la inhibición de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o la activación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , y estimular la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales iónicos en la membrana plasmática, incrementando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Además, la actividad de enzimas que generan ROS, como la NADPH oxidasa y la NOS, puede estar regulada por estímulos que inducen cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Touyz, 2005; Trebak et al., 2010).

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales no dependientes de voltaje se produce tras la activación de receptores y/o la disminución de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares en el RS, esta última conocida como *entrada capacitiva de  $\text{Ca}^{2+}$*  que tiene lugar a través de canales tipo SOC (Parekh y Putney, 2005). La modulación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales no dependientes de voltaje por las ROS, incluyendo el  $\cdot\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se ha caracterizado principalmente en células no excitables de mamíferos incluyendo las células endoteliales (Barlow y White, 1998; Hu et al., 1998; Balzer et al., 1999; Redondo et al., 2004a; Redondo et al., 2004b; Poteser et al., 2006), y en menor grado en las células excitables del MLV, donde la información sigue siendo escasa.

La regulación alterada de la producción y/o metabolismo de las ROS -estado conocido como estrés oxidativo- promueve el aumento de la vasoconstricción, el crecimiento y la inflamación y juega un papel crítico en la patogénesis de diversas enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la diabetes y la aterosclerosis (Griendling et al., 2000; Paravicini y Touyz, 2008). El SM se caracteriza por la coexistencia de varias anormalidades metabólicas que constituyen factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, incluyendo resistencia a la insulina, dislipidemia y adiposidad visceral en el mismo individuo. Esta situación patológica se ha definido con elevados niveles de estrés oxidativo vascular (Furukawa et al., 2004), y representa un factor de riesgo de enfermedad isquémica cardíaca (Arbel et al., 2015). La excesiva producción de radicales libres y daño oxidativo constituyen un mecanismo común en la aparición y el desarrollo de factores de riesgo asociados al SM. Por lo tanto, el estrés oxidativo puede explicar la perpetuación de la resistencia a la insulina, la alteración de la producción de energía, la disfunción endotelial y la aparición de complicaciones vasculares en condiciones de SM (Bonomini et al., 2015).

Ya que la vasodilatación coronaria y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en los miocitos cardíacos están regulados por mecanismos REDOX, la hipótesis de este trabajo es que ROS como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  serían capaces de modular la vasoconstricción y los flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias coronarias con el fin

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

de acoplar el flujo sanguíneo coronario al metabolismo cardiaco. Además, en situaciones de estrés oxidativo y disfunción vascular como el Síndrome Metabólico, las acciones del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el tono arterial coronario y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estarían alterados.

Por todo lo expuesto, los objetivos específicos del presente trabajo han sido:

1. Evaluar si el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede tener acciones vasoconstrictoras en las arterias coronarias, además de su papel bien establecido como vasodilatador endotelial coronario.
2. Determinar las vías de señalización que subyacen los efectos contráctiles inducidos por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incluyendo los mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , en arterias coronarias de rata *in vitro*.
3. Determinar la acción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de los mecanismos redox que regulan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC en el músculo liso vascular coronario.
4. Evaluar las posibles alteraciones de las acciones vasoactivas y de los mecanismos de señalización del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incluyendo las vías de  $\text{Ca}^{2+}$ , en las arterias coronarias en un modelo experimental de SM.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**



### 1. MATERIAL

#### 1.1. Material biológico

Los animales empleados en el presente estudio fueron utilizados de acuerdo con la legislación vigente sobre protección de animales de experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013). Los protocolos experimentales correspondientes fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

##### 1.1.1. Ratas Wistar Kioto

En el presente estudio se utilizaron arterias coronarias y mesentéricas obtenidas de ratas de la raza Wistar Kioto, criadas y mantenidas en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad en el animalario del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Los ejemplares utilizados fueron machos de 3 meses de edad alimentados con pienso y agua *ad libitum*.

##### 1.1.2. Ratas Zucker

Las RZO se han utilizado como modelo animal de SM, empleando como control sano ejemplares de ratas Zucker lean (RZL). Las RZO son un modelo animal de obesidad genética debido a una mutación en el gen que codifica el receptor de leptina, perdiendo así el estímulo de saciedad y simulando un estado de ayuno permanente, por lo que se alimentan descontroladamente desarrollando obesidad y produciéndose alteraciones similares a las que aparecen en el SM en humanos: hiperfagia, adiposidad visceral, hiperinsulinemia, alteración del perfil lipídico e hipertensión.

Los animales utilizados fueron machos de de 17-18 semanas de edad, proporcionados por *Charles River* (Barcelona, España) y mantenidos hasta su utilización en el animalario del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Una vez adquiridos, con 7-11 semanas de edad, se mantuvieron estabulados en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz, donde fueron alimentados con pienso y agua *ad libitum*.

## 1.2. Material de laboratorio

### 1.2.1. Instrumentación general:

Los aparatos utilizados para la preparación de soluciones y medios fisiológicos se enumeran a continuación:

- Balanza de precisión Sartorius.
- Agitadores magnéticos.
- pHmetro Crison.
- Sistema de filtración Mili-Q (Millipore™).
- Termostato de inmersión B. Braun, modelo Thermomix 1420.

### 1.2.2. Equipamiento para el registro de la tensión isométrica de las micropreparaciones arteriales:

- Miógrafos microvasculares dobles de 10 ml de capacidad con temperatura regulada y con dos transductores de fuerza isométricos (*Danish Myo Techonology, Dinamarca*).
- Polígrafos Houston de dos canales para el registro analógico de la fuerza ejercida por las arterias en tiempo real.
- *Powerlab*, software informático para el registro digital de la fuerza en tiempo real.
- Microscopio estereoscópico Leica.
- Fuente de luz fría Leica, para la disección y montaje de las preparaciones arteriales.

### 1.2.3. Equipamiento para el registro simultáneo de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la tensión isométrica en micropreparaciones arteriales:

- Monocromador DeltaRAM X (Photon Technology International) utilizado para excitar a dos longitudes de onda las arterias, a 340 nm y a 380nm.
- Sistema de detección fotomultiplicador 814 (Photon Technology International).
- Lámpara UV de Xenon LPS-220B (Photon Technology International).
- Miógrafo microvascular simple de 8 ml de capacidad con temperatura regulada y con un transductor de fuerza isométrico (*Danish Myo Techonology, Dinamarca*). Sólo permite montar un segmento arterial, por lo que en los estudios con arterias de

## MATERIAL Y MÉTODOS

animales con SM se montaron RZL y RZO en días consecutivos, siendo alternados entre sí segmentos de distintos animales.

- Microscopio de fluorescencia invertido Zeiss, Axiovert S100 T (Zeiss, España), sobre el que se colocó el miógrafo para el enfoque del segmento arterial. Se utilizó un objetivo para fluorescencia Olympus LUCPlanFLN 20x.
- Software informático Felix32 (Photon Technology International).

### 1.2.4. Equipamiento para el registro de la producción de aniones superóxido por métodos de quimioluminiscencia:

- Luminómetro BMG Fluostar Optima.
- Microscopio estereoscópico Leica.
- Fuente de luz fría Leica, para la disección de las preparaciones arteriales y del tejido miocárdico.
- Software informático Lumistar optima (BMG Labtech).

### 1.3. **Reactivos**

Para la realización de los experimentos se utilizaron los siguientes compuestos y reactivos:

- 2-APB, bloqueante de canales de  $Ca^{2+}$  tipo SOC (Tocris, Gran Bretaña).
- 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcador fluorescente azul que se une a las regiones ricas en adenina y timina del ADN (Invitrogen, Gran Bretaña).
- 5-hidroxi-triptamina (5-HT) clorato (Sigma Aldrich, España).
- Acetilcolina clorato (Sigma Aldrich, España).
- Ácido etilenglicol bis (2-aminoetiléter) N,N,N',N' tetra-acético (EGTA) (Sigma Aldrich, España).
- Alexa Fluor 594 goat-antirabbit, anticuerpo secundario unido a un marcador fluorescente rojo (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Alexa Fluor 488 goat-antimouse, anticuerpo secundario unido a un marcador fluorescente verde (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Anticuerpo monoclonal de conejo anti-COX2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Anticuerpo murino anti-eNOS (Chemicon International Inc).
- Apocinina, inhibidor específico de la NADPH oxidasa (Sigma Aldrich, España).
- Catalasa, enzima que descompone el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y agua (Sigma Aldrich, España).
- CAY-10441, antagonista selectivo del receptor de  $\text{PGI}_2$  (Cayman Chemical, USA).
- Cloruro de Bario (Sigma Aldrich, España).
- Cloruro de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sigma Aldrich, España).
- CPA, inhibidor específico de la SERCA del RS (Tocris, Gran Bretaña).
- Cremophor EL<sup>®</sup> (Biochemika, Fluka).
- Dithiothietol (DTT), agente fuertemente reductor de enlaces disulfuro y que previene la oxidación de grupos tiol (Sigma Aldrich, España).
- Fura-2 AM, marcador fluorescente de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Gadolinio (Sigma Aldrich, España).
- HEPES sal de sodio (Sigma Aldrich, España).
- ICI 192, antagonista de receptores de tromboxano  $\text{A}_2$  (Tocris, Gran Bretaña).
- Indometacina, inhibidor no selectivo de ciclooxigenasa (Sigma Aldrich, España).
- Ionomicina sal de  $\text{Ca}^{2+}$ , ionóforo del  $\text{Ca}^{2+}$  (Invitrogen, Gran Bretaña).
- L-Fenilefrina (Phe) hidrocloreto (Sigma Aldrich, España).
- Lucigenina (Sigma Aldrich, España).
- Manganeso (II) Cloruro 4-hidrato ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) (PRS, Panreac, España).
- Nifedipina, bloqueante de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Sigma Aldrich, España).
- NS 398, inhibidor selectivo de la COX-2 (Tocris, Gran Bretaña).
- PD-98059, inhibidor específico de la ERK MAPK (Tocris, Gran Bretaña).
- $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sigma Aldrich, España).
- Pluronic F-127 low UV (Invitrogen, Gran Bretaña).
- Pyr6, inhibidor selectivo de Orai (Calbiochem, USA).
- SB 239063, inhibidor específico de la p38 MAPK (Sigma Aldrich, España).
- Tempol, *scavenger* (atrapador) de radicales libres (Sigma Aldrich, España).
- U46619, agonista del receptor TP (Sigma Aldrich, España).
- Y-27632, inhibidor específico de la Rho cinasa (Tocris, Gran Bretaña).

**1.4. Soluciones**

Todas las soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico, disueltas en agua desionizada de alta pureza (Mili-Q). A continuación se detalla la composición de las soluciones empleadas:

1.4.1. Soluciones fisiológicas

1.4.1.1. *Solución salina fisiológica*

La composición de la solución salina fisiológica (PSS) utilizada es la siguiente (en mM):

|  |        |
|--|--------|
| - Cloruro sódico (NaCl)                                    | 119.00 |
| - Bicarbonato sódico (NaHCO <sub>3</sub> )                 | 25.00  |
| - Cloruro potásico (KCl)                                   | 4.60   |
| - Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )  | 1.40   |
| - Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> )                   | 1.20   |
| - Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> )                     | 1.50   |
| - Ácido etilén diamino tetracético (EDTA)                  | 0.027  |
| - Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) | 11.00  |

La solución se preparó a diario diluyendo los reactivos en agua destilada en continua agitación. La mezcla se dejó oxigenar durante 20 minutos con carbógeno (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>) con el fin de optimizar el pH de la misma a 7.4, y después se añadió el CaCl<sub>2</sub>. La adición de EDTA se realizó con el fin de retrasar la oxidación e impedir el crecimiento bacteriano.

1.4.1.2. *Solución salina fisiológica rica en potasio*

La solución salina fisiológica rica en potasio (KPSS) se preparó a diario, y su composición es la siguiente (en mM):

|  |        |
|--|--------|
| - Cloruro potásico (KCl)                                   | 119.00 |
| - Bicarbonato sódico (NaHCO <sub>3</sub> )                 | 25.00  |
| - Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) | 11.00  |
| - Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )  | 1.40   |
| - Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> )                   | 1.20   |
| - Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> )                     | 1.50   |
| - Ácido etilén diamino tetracético (EDTA)                  | 0.027  |

## MATERIAL Y MÉTODOS

En esta solución se sustituyeron cantidades equimolares de NaCl por KCl con respecto a la solución PSS normal. Los reactivos se diluyeron conjuntamente en agua desionizada y en agitación, dejando oxigenar después con carbógeno durante 20 minutos y finalmente añadiendo el  $\text{CaCl}_2$ .

### 1.4.1.3. Solución salina fisiológica de potasio 30 mM:

La solución salina fisiológica de potasio 30 mM ( $\text{K}^+30$ ) se prepara a diario, realizando una mezcla de PSS y KPSS hasta obtener la concentración deseada de potasio.

### 1.4.1.4. Soluciones salinas fisiológicas libres de $\text{Ca}^{2+}$

La composición de la solución PSS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{PSS}_{0.1}^0$ ) y de la solución nominalmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{PSS}_0^0$ ) son muy similares a la solución PSS. La solución  $\text{PSS}_{0.1}^0$  se preparará sustituyendo el  $\text{CaCl}_2$  por 0.1 mM de EGTA, un compuesto quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la solución  $\text{PSS}_0^0$  omitiendo el  $\text{CaCl}_2$  y el EGTA.

### 1.4.2. Soluciones de calibración para los experimentos de Fura-2:

#### 1.4.2.1. $\text{K}^+$ -HEPES<sub>2</sub><sup>0</sup>:

Ajustando el pH a 7.45, su composición en mM es:

|   |       |
|---|-------|
| - Cloruro potásico (KCl)                          | 144.6 |
| - Cloruro magnésico ( $\text{MgCl}_2$ )           | 1.2   |
| - HEPES   | 5.0   |
| - Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) | 6.1   |
| - EGTA  | 2.0   |

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.4.2.2. $K^+$ -HEPES<sup>5</sup>:

Ajustando el pH a 7.45, su composición en mM es:

|  |       |
|--|-------|
| - Cloruro potásico (KCl)                                   | 144.6 |
| - Cloruro magnésico (MgCl <sub>2</sub> )                   | 1.2   |
| - Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> )                     | 5.0   |
| - HEPES  | 5.0   |
| - Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ) | 6.1   |

### 1.4.3. Solución para los experimentos de quimioluminiscencia:

Su composición en mM es:

|   |       |
|---|-------|
| - Cloruro sódico (NaCl)                                   | 118.0 |
| - Cloruro potásico (KCl)                                  | 4.7   |
| - Glucosa   | 5.6   |
| - HEPES   | 10    |
| - Fosfato monopotásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) | 1.20  |
| - Sulfato de magnesio anhidro (MgSO <sub>4</sub> )        | 0.15  |
| - Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> )                    | 1.50  |

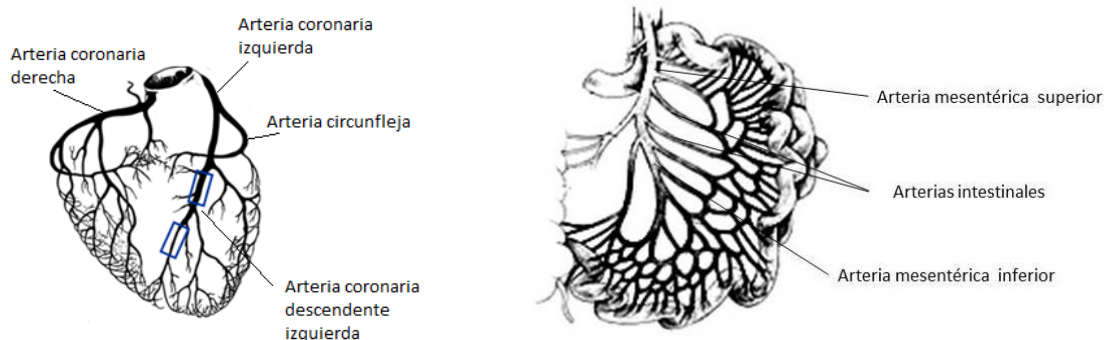
## 2. MÉTODOS

### 2.1. Estudios funcionales

#### 2.1.1. Preparación y microdissección de las preparaciones arteriales

En el presente estudio se utilizaron ramas de la arteria coronaria descendente izquierda de primer, segundo y tercer orden, y arterias mesentéricas de tercer orden procedentes de ratas Wistar Kioto de tres meses de edad; y arterias coronarias de segundo y tercer orden de ratas Zucker de 17-18 semanas de edad. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posterior exanguinación.

El corazón y el mesenterio fueron extraídos rápidamente con la ayuda de unas pinzas de disección romas y un bisturí y se mantuvieron en PSS a 4-8 °C. Las arterias se disecaron cuidadosamente utilizando como material instrumental unas tijeras de Westcott y unas pinzas con ayuda de un estereomicroscopio y una fuente de luz fría, separando antes el miocardio, y el tejido conjuntivo y adiposo que rodea a las arterias. Se obtuvieron segmentos arteriales de 2 mm de longitud que se situaron en la cámara del miógrafo.



**Figura XVIII.** Esquema representativo de los segmentos arteriales de la arteria coronaria descendente izquierda (izquierda) y de la arteria mesentérica (derecha) de segundo y tercer orden, utilizadas en los experimentos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1.2. Montaje de las arterias en el miógrafo

Cada segmento arterial fue montado en paralelo en miógrafos microvasculares dobles insertando dos alambres de tungsteno de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro a través de la luz vascular, alambres que se sujetan a los tornillos situados en los dos soportes móviles de los canales de montaje.

Los miógrafos microvasculares utilizados se componen de un baño de 10 ml de capacidad, con temperatura regulada y en cuyo interior tienen dos canales de montaje de segmentos arteriales. Cada canal de montaje está acoplado por un lado a un transductor de fuerza isométrico que registra los cambios de tensión que experimentan las arterias, y por el otro lado a un tornillo micrométrico que regula la separación entre los alambres que atraviesan el segmento arterial (Mulvany y Halpern, 1977).

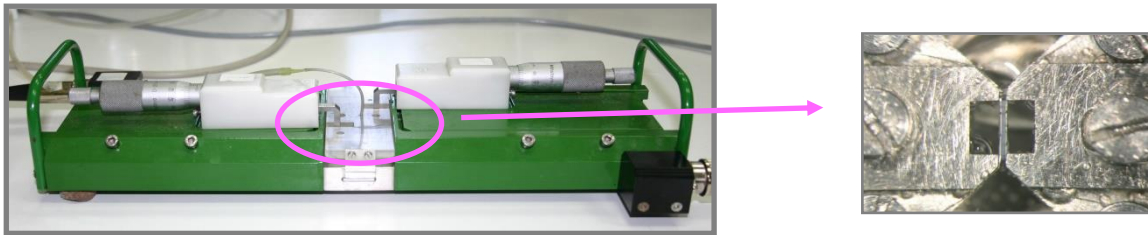


Figura XIX. Montaje de las arterias coronarias en un miógrafo microvascular doble.

### 2.1.3. Normalización de las arterias

Una vez montadas las arterias se estabilizaron durante 30 minutos antes de comenzar los experimentos manteniéndolas en 10 ml de PSS. La solución se equilibró con carbógeno (95%  $\text{O}_2$  – 5%  $\text{CO}_2$ ) para conseguir un pH de 7.4, manteniendo el baño a una temperatura de 37°C. Previamente al comienzo de cada experimento se procedió a calcular la tensión óptima de trabajo para cada segmento arterial. Para ello, se calculó la relación existente entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso para calcular la circunferencia interna ( $L_{100}$ ) correspondiente a una presión transmural de 100 mmHg para un vaso relajado *in situ*.

A continuación, para cada segmento, se situó el tornillo micrométrico a una distancia suficiente para aplicar una circunferencia interna  $L_1$ , siendo  $L_1=0.9 \times L_{100}$ , circunferencia a la cual el desarrollo de la fuerza es máximo. El cálculo del diámetro luminal interno efectivo fue determinado como  $l_1=L_1/\pi$  (Mulvany y Halpern, 1977).

## 2.2. Determinación del $Ca^{2+}$ intracelular por ratio-fluorometría

### 2.2.1. Introducción a la fluorescencia

La medida de la  $[Ca^{2+}]_i$  mediante el empleo de sondas fluorescentes ha sido el método más extendido para los estudios de la sensibilización al  $Ca^{2+}$  y la entrada dinámica de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana en el MLV (Himpens y Casteels, 1987). La sonda fluorescente Fura-2 fue introducida como indicador de la  $[Ca^{2+}]_i$  con numerosos aspectos mejorados comparando con otros indicadores que ya habían sido usados previamente tales como quin2 (Grynkiewicz et al., 1985). En la molécula de Fura-2, cuatro grupos carboxilo proporcionan el sitio de unión al  $Ca^{2+}$  y un grupo derivado del estilbena le confiere sus propiedades fluorescentes. Así, el Fura-2 es una molécula hidrofílica que se une al  $Ca^{2+}$  de forma específica, pero en su forma acetoximetil éster (Fura-2 AM) se convierte en una molécula hidrofóbica capaz de atravesar sin dificultad las membranas biológicas. Una vez ésta se localiza en el citosol, las esterasas citosólicas romperán los enlaces éster liberando su forma ácido, la cual debido a su carácter hidrofílico queda atrapada en el interior celular pudiendo unirse al  $Ca^{2+}$  libre para formar el complejo Fura- $Ca^{2+}$ . En cualquier caso, la molécula de Fura-2 muestra propiedades fluorescentes tanto en su forma libre como unida al  $Ca^{2+}$ , pero es en esta forma cuando su fluorescencia se incrementa hasta dos veces y su espectro de excitación se desplaza a longitudes de onda menores (en el rango de 362 a 335 nm). La excitación fluorescente de este complejo da lugar a una emisión fluorescente cuyo máximo se sitúa a 510 nm. Este desplazamiento en la longitud de onda se mide como ratio entre la emisión a una longitud de onda de excitación a 340 nm (F340) y a 380 nm (F380). El ratio ( $R=F340/F380$ ) se relaciona con la  $[Ca^{2+}]_i$  por la siguiente ecuación (Grynkiewicz et al., 1985):

$$[Ca^{2+}] = K_d \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{F_{380 max}}{F_{380 min}}$$

## MATERIAL Y MÉTODOS

Dónde  $K_d$  es la constante de disociación del complejo Fura-2/ $Ca^{2+}$ ;  $R_{\min}$  y  $R_{\max}$  son el ratio mínimo (en ausencia de  $Ca^{2+}$ ) y el ratio máximo (en condiciones de saturación de  $Ca^{2+}$ ), respectivamente;  $F_{380-\max}$  y  $F_{380-\min}$  son la emisión máxima (ausencia de  $Ca^{2+}$ ) y emisión mínima (saturación de  $Ca^{2+}$ ) con excitación a 380 nm.

### 2.2.2. Medidas simultáneas de $Ca^{2+}$ intracelular y tensión isométrica

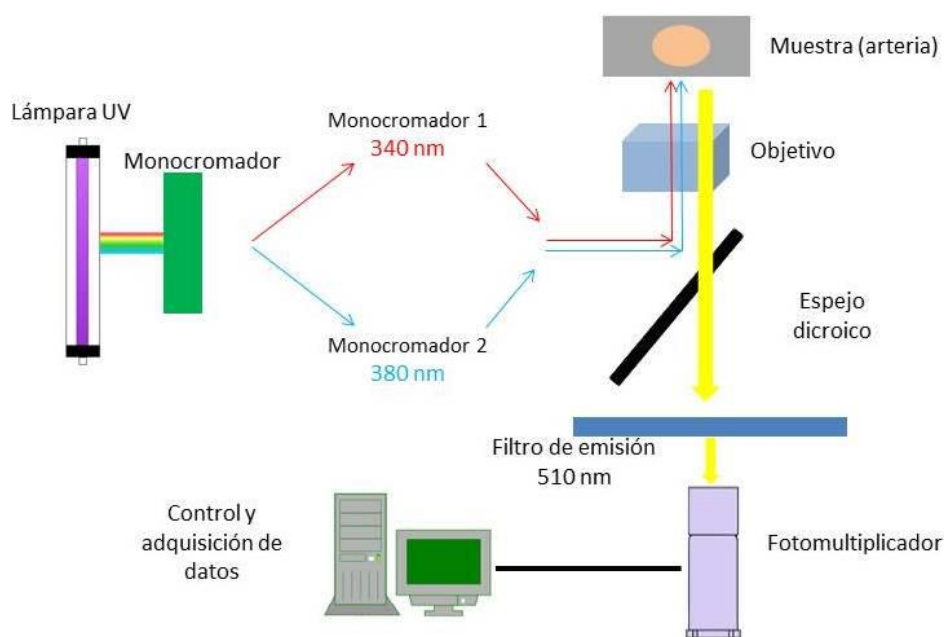
Las medidas simultáneas de  $[Ca^{2+}]_i$  y tensión llevadas a cabo en este estudio fueron realizadas en arterias coronarias montadas en un miógrafo simple como se describe en el apartado 2.1.1.2, y de acuerdo con la técnica inicialmente descrita para arterias de resistencia mesentéricas (Jensen et al., 1992). El protocolo de “cargado” con Fura-2 se puso a punto de forma específica para las arterias coronarias, y se realizó incubando las preparaciones arteriales con Fura-2-AM (8  $\mu$ M) durante 2 horas a 37 °C en la oscuridad, lavando 3 veces en PSS después de una hora.

El miógrafo se colocó sobre la pletina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100, donde la preparación fue iluminada de forma alterna con dos longitudes de onda diferentes, 340 y 380 nm, a una frecuencia de 10 Hz. La selección de estas longitudes de onda corresponde a los máximos de los registros de fluorescencia de soluciones de Fura-2 saturadas de  $Ca^{2+}$  (340 nm) y de Fura-2 libre de  $Ca^{2+}$  (380 nm). El haz de luz monocromada se conduce desde una rueda de filtros hasta el microscopio con una guía líquida. La luz es reflejada hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que transmite las longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las longitudes de onda inferiores. De este modo, sólo alcanzan la muestra la luz de 340 y 380 nm, mientras que la luz fluorescente emitida por el Fura-2 en el rango de 500 a 530 nm atraviesa el espejo dicróico y es conducida al fotomultiplicador pasando a través de un filtro interferencial de paso de banda centrado en 510 nm. La fluorescencia de emisión a las dos longitudes de onda ( $F_{340}$  y  $F_{380}$ ) y la fuerza (mN) son registradas simultáneamente mediante el software Felix (Photon Technology International, USA). Los valores indicados anteriormente ( $R_{\min}$ ,  $R_{\max}$ ,  $F_{380-\max}$  y  $F_{380-\min}$ ) se determinaron mediante un método que compromete la viabilidad de la preparación y que por lo tanto se realiza al final de cada protocolo experimental. Las condiciones de  $Ca^{2+}$  mínimas y de saturación se realizaron mediante la incubación de la preparación con el ionóforo ionomicina en una solución con EGTA ( $K^+$  -HEPES<sup>0</sup>) y con una solución rica en  $Ca^{2+}$  ( $K^+$  -HEPES<sup>5</sup>), respectivamente (ver composición en el Apartado 1.4.2). Finalmente, la contribución de la autofluorescencia de la preparación se

## MATERIAL Y MÉTODOS

determinó mediante “*quenching*” del Fura-2 con  $Mn^{2+}$  cuyos valores obtenidos fueron sustraídos de todas las medidas obtenidas durante el experimento.

Los registros que se muestran corresponden a la relación o ratio entre la fluorescencia a 340 y 380 nm ( $F_{340}/F_{380}$ ) en función del tiempo expresados bien como valores absolutos o como porcentaje de las señales máximas de  $Ca^{2+}$  en cada arteria inducidas por KPSS.



**Figura XX. Esquema representativo del sistema de microfluorimetría.** La luz de excitación proviene de una lámpara ultravioleta pasando por un monocromador que selecciona las longitudes de onda a 340 y a 380 nm, que llegan al microscopio a través de una guía líquida, se refleja en un espejo dicróico centrado en 430 nm y alcanza la preparación a través del objetivo del microscopio. La luz fluorescente emitida por el Fura-2 intracelular es capturada por el objetivo, atravesando el espejo dicróico (> 430 nm) y dirigiéndose hasta el filtro de emisión centrado en 510 nm hasta el fotómetro. Las señales emitidas por la muestra a 510 nm, debidas a la excitación de la misma a 340 nm (Fura-2 unido a  $Ca^{2+}$ ) y a 380 nm (Fura-2 libre) son recogidas para el cálculo del ratio  $R=F_{340}/F_{380}$ , como indicador del  $Ca^{2+}$  intracelular.

### 2.3. Protocolos experimentales para los estudios funcionales

#### 2.3.1. Protocolos para el estudio de las acciones vasculares del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias y mesentéricas de ratas Wistar

Los experimentos de reactividad vascular en las arterias coronarias se realizaron el mismo día del sacrificio del animal; las arterias mesentéricas se montaron el mismo día o el día después del sacrificio del animal, ya que se ha observado que su reactividad no se ve modificada pasadas 24 horas, manteniéndolas en PSS a 4 °C hasta su uso.

En cada miógrafa microvascular doble se montaron de forma paralela dos segmentos arteriales de ratas Wistar para evaluar conjuntamente su funcionalidad. Una vez montados y normalizados los segmentos arteriales se procedió a comprobar la integridad de la pared muscular así como su capacidad contráctil, mediante dos adiciones consecutivas de KPSS al baño del miógrafa, de 3 minutos de duración cada una, y espaciadas 10 minutos para permitir la relajación del vaso.

La integridad funcional del endotelio vascular fue puesta de manifiesto al adicionar una dosis de acetilcolina de 10 µM a cada segmento vascular previamente precontraído, al final de cada protocolo experimental, y comprobar la relajación del mismo con valores de relajación mayores o iguales a un 80%.

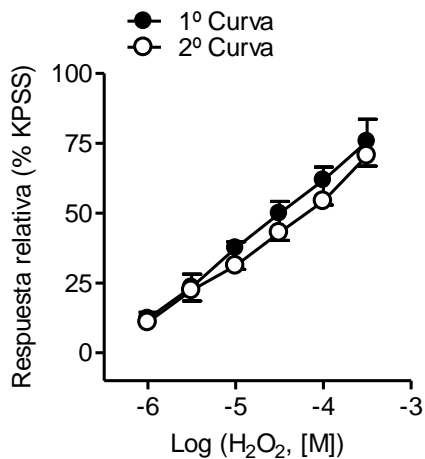
##### 2.3.1.1. *Protocolos experimentales para el estudio de las acciones vasculares del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Para estudiar las acciones vasculares desempeñadas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y las vías de señalización a través de las cuales se producen estos efectos en las arterias coronarias y mesentéricas, se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) añadiendo dosis crecientes semilogarítmicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (M): 10<sup>-6</sup>, 3x10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 3x10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 3x10<sup>-4</sup>, bajo diferentes condiciones experimentales:

- Línea base.
- Precontracción con 5-HT 2x10<sup>-6</sup> M (arteria coronaria).
- Precontracción con Phe 3x10<sup>-6</sup> M (arteria mesentérica).
- Precontracción con K<sup>+</sup>30.
- Precontracción con U46619 3x10<sup>-6</sup> M.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El efecto vasoconstrictor del  $H_2O_2$  se determinó en dos CCR consecutivas, realizando lavados en PSS cada 15 minutos durante una hora. Tras comprobarse que no existe taquifilaxia al efecto del  $H_2O_2$  en arteria coronaria (Figura XXI), se procedió a realizar dichas curvas, primero en ausencia del agente a estudiar y a continuación tras incubación de las arterias con dicho agente durante 20-30 minutos.



**Figura XXI. En el efecto contráctil del  $H_2O_2$  en arterias coronarias no se observa taquifilaxia.**

Contracción inducida por el  $H_2O_2$  en arterias coronarias precontraídas con  $K^+30$ , al realizar dos CCR de  $H_2O_2$  consecutivas. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media  $\pm$  ESM de 8 arterias.

La participación de la vía de la COX en las acciones del  $H_2O_2$  se determinó realizando las CCR en presencia de indometacina (1  $\mu$ M), inhibidor no selectivo de la COX; y de ICI 192 (3  $\mu$ M), antagonista del receptor del  $TXA_2$ . La implicación de los radicales  $\cdot O_2^-$  se determinó mediante la utilización de tempol (30  $\mu$ M), un *scavenger* de radiales libres, y de apocinina (100  $\mu$ M), un inhibidor de la NADPH oxidasa. La participación de las MAPK en las vías de señalización del  $H_2O_2$  se determinó mediante la utilización de inhibidores de distintas enzimas: PD 98059 (3  $\mu$ M), inhibidor de la ERK MAPK; SB 239063 (1  $\mu$ M), inhibidor de p38 MAPK; y el inhibidor de la Rho quinasa Y-27632 (3  $\mu$ M). El papel desempeñado por el endotelio en los mecanismos vasculares ejercidos por el  $H_2O_2$  se determinó en arterias cuyo endotelio fue retirado mecánicamente mediante la fricción de la luz vascular con un cabello humano.

2.3.1.2. *Protocolos para el estudio del papel de los canales de  $Ca^{2+}$  en la vasoconstricción inducida por  $H_2O_2$*

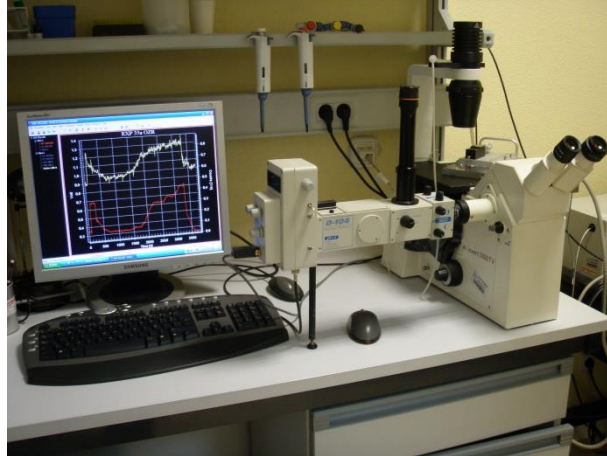
El estudio del papel desempeñado por el  $Ca^{2+}$  en las acciones vasculares del  $H_2O_2$  se determinó mediante la utilización del *set-up* de  $Ca^{2+}$  previamente descrito en el apartado 2.2.2. Las arterias se estimularon al comienzo de cada protocolo con KPSS para comprobar la capacidad contráctil de la arteria y la entrada de  $Ca^{2+}$  al citosol por la activación de canales de  $Ca^{2+}$  voltaje-dependientes tipo L mediante despolarización.

Se estudiaron simultáneamente las variaciones en el  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión inducidas por el  $H_2O_2$  ( $10^{-4}$  M) en arterias coronarias precontraídas con  $K^+30$ . Con el objetivo de estudiar la participación de los distintos tipos de canales de  $Ca^{2+}$  en los efectos vasoactivos del  $H_2O_2$ , las arterias coronarias se incubaron durante 10 minutos con nifedipina (1  $\mu$ M), un inhibidor selectivo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, y 2-APB (50  $\mu$ M), un inhibidor no selectivo de canales de  $Ca^{2+}$  tipo SOC. Estos protocolos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de endotelio funcional, con el fin de determinar el papel del endotelio en las variaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  y de tensión inducidas por el  $H_2O_2$  en las células del MLV.

Con el fin de estudiar el papel de los prostanoideos en las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la tensión en las células del MLV coronario, se determinó el efecto inducido por el agonista de los receptores de  $TXA_2$ , el U-46619 (0,1  $\mu$ M), en presencia y ausencia de nifedipina.

El estudio de la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular a través de canales SOC, se llevó a cabo mediante un protocolo en el que se sustituye la solución PSS del baño por  $PSS_{0,1}^0$  donde se mantuvieron las arterias durante 5 minutos. A continuación, el baño del miógrafo se llenó de  $PSS_0^0$  en presencia de nifedipina durante 10 minutos. Bajo estas condiciones se añadió el  $H_2O_2$  ( $10^{-4}$  M) y tras 8 minutos, se añadió al medio  $Ca^{2+}$  (1,5 mM), determinándose el papel del  $Ca^{2+}$  intracelular en los efectos vasoactivos del  $H_2O_2$ , midiendo la  $[Ca^{2+}]_i$  y la contracción que se produce en estas condiciones a los 5, 10, 15 y 20 minutos. Este protocolo se repitió en ausencia de endotelio.

## MATERIAL Y MÉTODOS



**Figura XXI.** Set-up de calcio para el registro simultáneo de la concentración de calcio intracelular y la tensión isométrica de la arteria.

Los estudios siguientes se enfocaron a determinar el papel de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC en las variaciones de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producidas por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las células del MLV, para ello se realizaron los siguientes estudios en arterias coronarias desprovistas de endotelio, siguiendo el mismo protocolo de los estudios anteriores:

La *entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$*  en las arterias coronarias se evaluó sustituyendo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los protocolos anteriores por CPA (20  $\mu\text{M}$ ), previa a la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio. Para determinar si el  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce la depleción de los depósitos intracelulares y la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma concentración dependiente, se estudió el efecto producido por tres concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diferentes (30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  y 300  $\mu\text{M}$ ).

Se determinó la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales no selectivos de cationes inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a través de la retirada de  $\text{Ca}^{2+}$  del medio extracelular y midiendo la entrada de bario (1,5 mM), otro catión divalente. También se determinó el efecto del Gadolinio (50  $\mu\text{M}$ ), catión trivalente que actúa como bloqueante de los canales no selectivos de cationes, incubando las arterias coronarias con este catión durante 15 minutos previa evaluación de la respuesta al  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular.

El papel de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC, se determinó mediante el estudio del efecto del CPA y del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tras la incubación durante 15 minutos con el nuevo inhibidor selectivo de Stim1 y Orai1, Pyr6 (50  $\mu\text{M}$ ).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de estudiar el efecto de la oxidación de grupos tiol dependiente de  $H_2O_2$  en la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canales SOC, se estudió el efecto del  $H_2O_2$  en arterias incubadas durante 10 minutos con el agente reductor DTT (100  $\mu M$ ).

Tras cada experimento se realizó el protocolo de calibración (explicado en el apartado 2.2.2.), para cuantificar las señales de fluorescencia inespecíficas no debidas a los movimientos de  $Ca^{2+}$  y restarlas de las señales obtenidas en cada experimento.

### 2.3.2. Protocolos experimentales para los estudios funcionales realizados en arterias coronarias y mesentéricas de ratas Zucker

#### *2.3.2.1. Protocolos experimentales para el estudio de las acciones vasculares del $H_2O_2$*

Para estudiar los efectos del  $H_2O_2$  en arterias coronarias y mesentéricas de ratas Zucker, como modelo de estudio de las alteraciones que se producen bajo condiciones de SM, se procedió realizar los protocolos experimentales de forma similar a la ya descrita en el apartado 2.3.1.1., comparando la acción del  $H_2O_2$  en arterias coronarias o mesentéricas precontraídas con  $K^+30$  o con 5-HT.

En cada miógrafo microvascular doble se montaron de forma paralela un segmento arterial de RZL y otro de RZO para evaluar conjuntamente su funcionalidad. Tras comprobar la capacidad contráctil y la integridad de la pared muscular mediante dos estimulaciones consecutivas con KPSS, espaciadas 10 minutos para permitir la relajación del vaso, se procedió a realizar las CCR, primero en ausencia del agente a estudiar y a continuación tras la incubación de las arterias con dicho agente durante 20-30 minutos. Se determinó la participación de la COX realizando la CCR en presencia de indometacina; de NS398 (1  $\mu M$ ), inhibidor selectivo de la COX-2; y de ICI 192, antagonista del receptor TP. También se determinó la participación de los radicales  $\cdot O_2^-$  mediante la utilización de tempol, un *scavenger* de radicales libres.

Con el fin de determinar el papel de los miocitos coronarios en la respuesta al  $H_2O_2$ , se realizaron CCR en ausencia de endotelio, de la misma forma que la descrita en el párrafo anterior. Se realizaron CCR en presencia de indometacina, de NS398, de ICI 192, del inhibidor de la  $PGI_2$  CAY-10441 (0,1  $\mu M$ ) y de tempol.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La integridad funcional del endotelio, o la ausencia del mismo, en cada caso, se puso de manifiesto con la relajación ante una dosis única de acetilcolina, en arterias previamente contraídas con  $K^+30$ .

### 2.3.2.2. *Protocolos para el estudio del papel de los canales de $Ca^{2+}$ en la vasoconstricción inducida por $H_2O_2$ en condiciones de Síndrome Metabólico*

De la misma forma que en el apartado 2.3.1.2., se utilizó el *set-up* de  $Ca^{2+}$  para determinar las diferencias en el efecto vasoactivo del  $H_2O_2$  y las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ . La capacidad contráctil de cada segmento arterial se comprobó mediante la despolarización con KPSS.

Las diferencias en las variaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión inducidas por el  $H_2O_2$  ( $10^{-4}$  M) en condiciones de SM fueron determinadas en arterias coronarias de RZL y RZO precontraídas con  $K^+30$ .

También se determinó el papel de la COX-2 y del  $TXA_2$  en las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la tensión ejercidas por el  $H_2O_2$ , mediante la preincubación de las arterias coronarias durante 15 minutos con NS398 y de ICI 192.

Para determinar posibles diferencias en la entrada de  $Ca^{2+}$  tipo SOC inducida por  $H_2O_2$  en los miocitos vasculares en condiciones de SM, se llevó a cabo el protocolo descrito en el apartado 2.3.1.2. En RZO, además, se determinó la corriente SOC inducida por el CPA.

## 2.4. **Medida de la producción de aniones superóxido por quimioluminiscencia**

Se utilizó la técnica de quimioluminiscencia de la lucigenina en arterias intactas (Prieto et al., 2010) para determinar el nivel de producción de  $\cdot O_2^-$  en arterias coronarias y en tejido miocárdico en condiciones basales y tras su estimulación con  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) y con tempol. Para ello, segmentos arteriales y muestras de tejido de 4-5 mm de largo se estabilizaron en PSS a temperatura ambiente durante 30 minutos, y fueron posteriormente incubados en presencia o ausencia de tempol o de NS 398 durante 30 minutos a 37°C.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Después de la incubación, las muestras fueron transferidas a pocillos de placas de microtitulación que contienen 5  $\mu\text{M}$  de lucigenina (bis-Nmetilacridinium nitrato) en PSS tamponada con 10 mM de HEPES-NaOH, en ausencia y en presencia de tempol. Por último, se añadió una dosis única de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de NS 398 a cada pocillo.

La lectura de los radicales  $\cdot\text{O}_2^-$  producidos, se midió a continuación en un luminómetro (BMG Fluostar Optima), durante una serie de 4-5 ciclos. Los valores de la línea base fueron restados de los valores hallados en las diferentes condiciones experimentales y la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  se normalizó a peso de tejido.

### 2.5. Inmunohistoquímica

Las muestras de tejido cardiaco incluyendo la arteria coronaria descendente izquierda de RZL y RZO, fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino 0,1 M, durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente fueron crioprotegidas con una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato salino para evitar la formación de cristales de hielo que pudieran dañar el tejido. A continuación, los bloques de tejido se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de ser cortados. Antes de realizar los cortes histológicos correspondientes, los bloques se dejaron aproximadamente 1 hora en el criostato para que alcanzaran la temperatura óptima para ser cortados como secciones transversales de 5-10  $\mu\text{m}$  de grosor. Las secciones se recogieron en portaobjetos gelatinizados que se congelaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Las secciones adheridas a los portaobjetos gelatinizados fueron preincubadas en suero de cabra al 10% en tampón fosfato salino y Triton-X-100 al 0.3% durante 2-3 horas. A continuación, las secciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal de conejo anti-COX2 (dilución 1:50) durante 48 horas. La expresión de la eNOS fue visualizada mediante inmunotinción con un anticuerpo murino anti-eNOS (dilución 1:500). Trascorrido este tiempo, las muestras se lavaron y se dejaron reaccionar con los anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados fueron: suero de cabra anticonejo Alexa Fluor 594 (dilución 1:200) y suero de cabra antimurino Alexa Fluor 488 (dilución 1:200). Los portaobjetos se cubrieron con un medio de montaje específico con DAPI, que tiñe todos los núcleos celulares. Las observaciones se realizaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51). No se pudo detectar inmunorreactividad en las secciones incubadas en

ausencia de los antisueros primarios. La preadsorción con proteínas de COX-2 no mostró reactividad cruzada con los anticuerpos.

## 2.6. Cálculos y análisis de los resultados

Las respuestas mecánicas de los vasos se expresan como tensión activa, es decir, el incremento de la fuerza registrada ( $\Delta F$ , en mN) dividido por dos veces la longitud del segmento arterial ( $\alpha$ , en mm):

$$\Delta T = \Delta F / 2\alpha$$

La sensibilidad de los agonistas contráctiles se expresa en términos de concentración eficaz 50 ( $CE_{50}$ ), que se define como la concentración del agonista que origina el 50% del efecto máximo,  $E_{m\acute{a}x}$ . El  $pD_2$  es el valor negativo del logaritmo de la  $CE_{50}$ :

$$pD_2 = -\log [CE_{50}]$$

La contracción máxima de los agonistas es expresada en valores absolutos ( $Nm^{-1}$ ) o relativos, como porcentaje de la respuesta contráctil máxima inducida por un agonista en cada arteria o porcentaje de la respuesta al KPSS. La  $CE_{50}$  fue estimada determinando el ajuste ("fitting") de la respuesta del vaso según la ecuación de Hill:

$$R = \frac{R_{max} \cdot A(M)^n}{A(M)^n + CE_{50}(M)^n}$$

Donde R es la respuesta del vaso para la concentración A (M) del agonista;  $R_{m\acute{a}x}$  es la respuesta máxima del vaso para el agonista y  $n$  es un parámetro de ajuste de la curva o "Coeficiente de Hill". El ajuste a la ecuación fue realizado con el programa informático GraphPad Prism 5.0. Las diferencias de estimar la  $CE_{50}$  por interpolación frente al ajuste de una curva son insignificantes, pero la ventaja de usar el ajuste no lineal es la posibilidad de estimar el Coeficiente de Hill que puede dar la información sobre el carácter de la respuesta del vaso.

Los resultados se expresan en forma de valores absolutos de tensión ( $Nm^{-1}$ ) o  $F_{340}/F_{380}$  o como porcentaje de las respuestas al KPSS, 5-HT, Phe o U46619, como media  $\pm$  el error estándar medio (ESM) de  $n$  (número de segmentos arteriales, 1-2 de cada animal en

## MATERIAL Y MÉTODOS

experimentos farmacológicos y 1 de cada animal en los experimentos de  $\text{Ca}^{2+}$ ); o en forma de cuentas por minuto (cpm) por mg de tejido en segmentos arteriales y en muestras de miocardio, como media  $\pm$  ESM de 4-22 animales en los experimentos de quimioluminiscencia. La evaluación estadística de las diferencias entre medias se ha realizado utilizando el test estadístico de la *t de Student* para observaciones pareadas o no pareadas, siempre y cuando la muestra se ajuste a una distribución normal o *Gaussiana*. La evaluación de las diferencias significativas entre medias de diversos grupos se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA) seguido de un *Test de Bonferroni* como post-test. Un nivel de probabilidad inferior a un 5% ( $P < 0.05$ ) fue considerado significativo. Todos los cálculos se han realizado utilizando un software estándar (Prism 5.0, GraphPad, San Diego, CA).



## **IV. RESULTADOS**

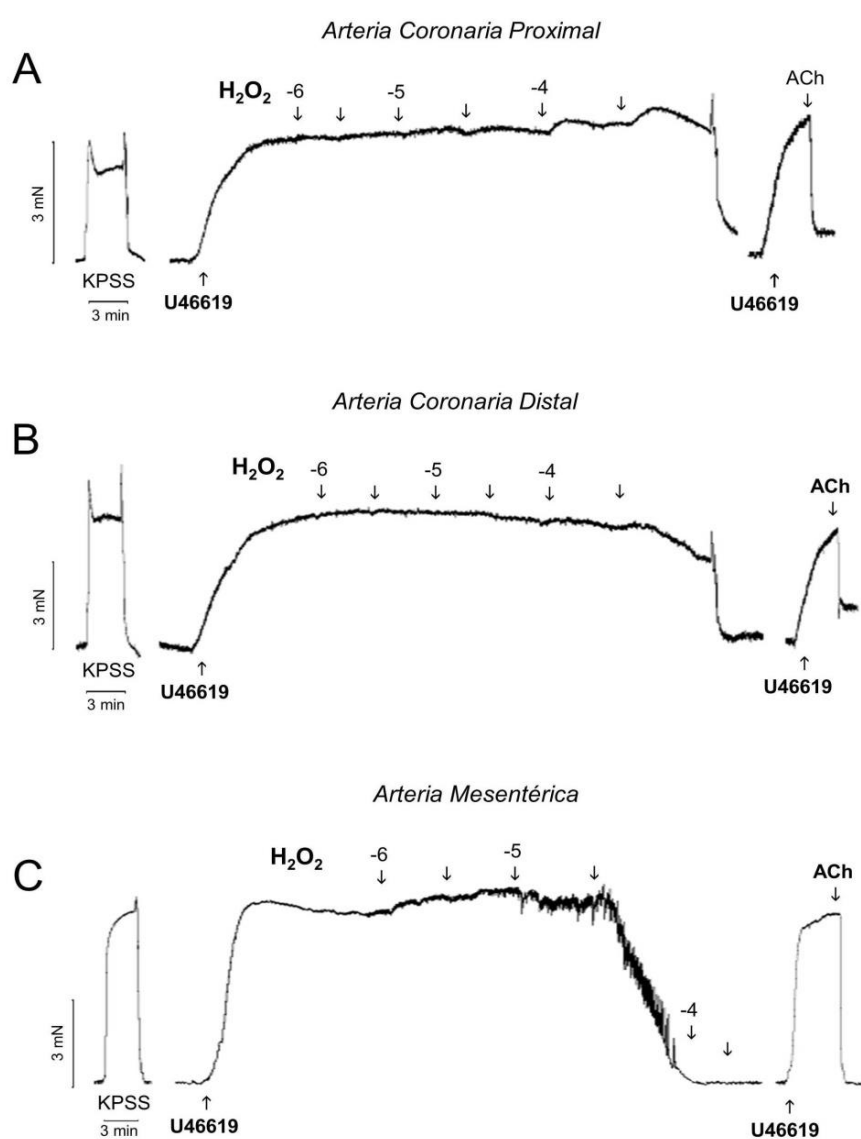


## RESULTADOS

### 1. EFECTOS VASOACTIVOS DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN ARTERIAS CORONARIAS DE RATAS WISTAR

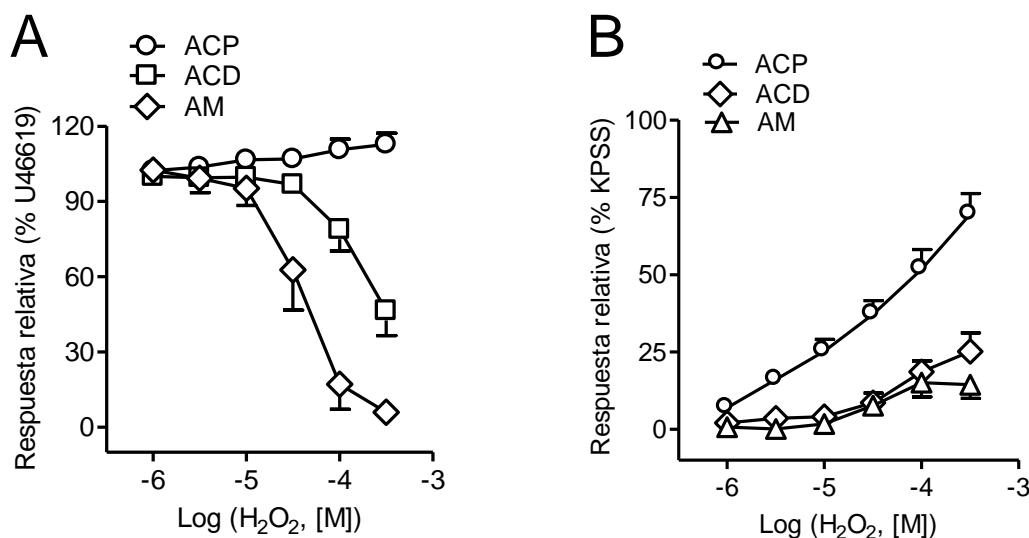
#### 1.1. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre arterias coronarias y mesentéricas precontraídas con el agonista del tromboxano A<sub>2</sub> U46619 y con K<sup>+</sup>30

La estimulación de las arterias coronarias precontraídas con el agonista del TXA<sub>2</sub> U46619 (3 μM) con concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-300 μM), produjo efectos vasoactivos diferentes en función de la localización y diámetro de los segmentos arteriales coronarios (Figuras 1A-1C; Figuras 2A-B).



**Figura 1.** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene efectos vasoactivos diferentes en arterias coronarias y mesentéricas contraídas con el agonista del TXA<sub>2</sub>, U46619. Los registros de tensión isométrica muestran los efectos de concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-300 μM) en ACP (A), ACD (B) y AM (C) precontraídas con U46619 (3 μM). La barra vertical muestra contracción en Nm<sup>-1</sup> y la horizontal tiempo en min.

## RESULTADOS



**Figura 2. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias y mesentéricas precontraídas con U46619 y con K<sup>+</sup>30.** (A) Efecto concentración-dependiente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ACP, ADC y AM precontraídas con U46619. (B) En ACP, la despolarización con K<sup>+</sup>30 magnifica el efecto contráctil mientras que en ACD y AM se desenmascara un moderado efecto contráctil. Los resultados se expresan como media ± ESM de 4-8 arterias.

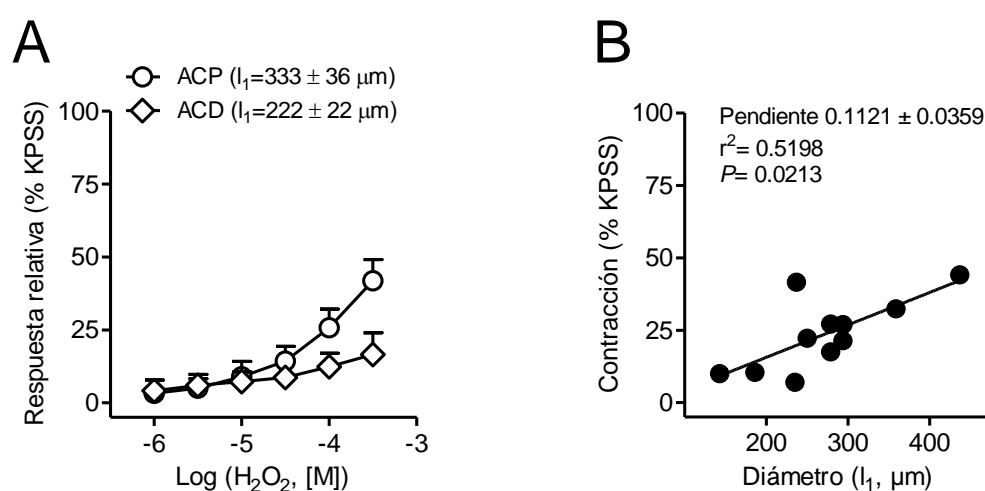
En las arterias coronarias proximales (ACP), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un efecto contráctil moderado, mientras que en las arterias coronarias distales (ACD) (segmentos de tercer orden de la arteria coronaria izquierda descendente anterior), se observó predominantemente un efecto relajante, sobre todo a las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> más elevadas (Figura 1A, B; Figura 2A). En un modelo de arterias de resistencia, como las arterias mesentéricas (AM) de tercer orden, precontraídas con U46619, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produjo un efecto relajante concentración-dependiente (Figura 1C; Figura 2A). Debido a esta diferencia en la reactividad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los segmentos arteriales coronarios, en los experimentos subsiguientes se utilizaron arterias coronarias proximales con el fin de caracterizar el efecto vasoconstrictor de este agente.

Cuando se elevó la concentración de K<sup>+</sup> del medio extracelular a 30 mM, las respuestas contráctiles observadas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la arteria coronaria proximal se incrementaron marcadamente, hasta un 70% de la contracción inducida por la solución KPSS. En arterias coronarias distales y en arterias mesentéricas la respuesta relajante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue abolida por la elevación de K<sup>+</sup> extracelular y se produjo un ligero efecto contráctil a las concentraciones más altas (Figura 2B).

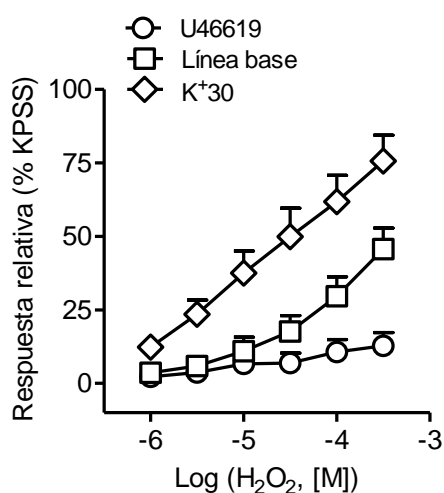
## RESULTADOS

### 1.2. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la tensión basal de las arterias coronarias

Al exponer a las arterias coronarias a la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin contracción previa del vaso, se observó un efecto contráctil significativamente mayor en las arterias coronarias proximales, en comparación con los segmentos distales, siendo la contracción máxima en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> directamente proporcional al diámetro interno del vaso estudiado. En la Figura 3A se muestra la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la tensión basal en arterias coronarias proximales y distales, y la Figura 3B muestra la correlación entre el diámetro interno del vaso estudiado y la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 3. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ejerce un efecto contráctil correlacionado con el diámetro interno de las arterias coronarias.** (A) El efecto contráctil inducido sobre la tensión basal de las arterias coronarias por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias es más marcado en ACP que en ACD. (B) El efecto contráctil observado es proporcional al diámetro interno del vaso. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 12 arterias.

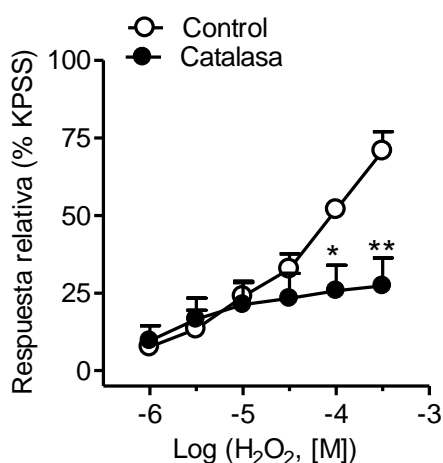


**Figura 4. El efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ve incrementado en arterias coronarias despolarizadas con K<sup>+</sup>30.** Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 5-12 arterias.

## 2. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN ARTERIAS CORONARIAS DE RATAS WISTAR

### 2.1. Efecto de la enzima catalasa en la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias

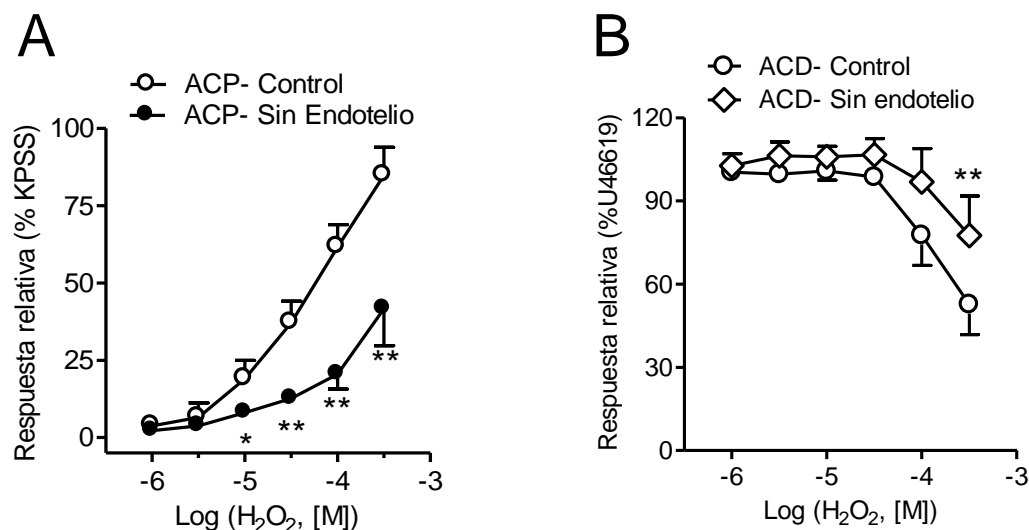
Con el fin de determinar si el efecto vasoactivo observado se debe específicamente a la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se determinó el efecto de la catalasa, enzima encargada de descomponer el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Tras la incubación de las arterias coronarias con catalasa (200 Uml<sup>-1</sup>), se observó una marcada disminución en la contracción inducida previamente por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin alterarse la producida por el K<sup>+</sup>30 (Figura 5).



**Figura 5. Efecto de la enzima catalasa en la vasoconstricción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ACP.** La catalasa (200 Uml<sup>-1</sup>) inhibió la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ACP, sin afectar a la contracción producida por el K<sup>+</sup>30. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 3 arterias. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.

### 2.2. La contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es dependiente del endotelio

Para determinar la contribución del endotelio vascular a la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se estudió su efecto en arterias coronarias precontraídas con K<sup>+</sup>30, cuyo endotelio fue retirado mecánicamente. Las contracciones inducidas por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se redujeron en las ACD sin endotelio, lo que sugiere que las células endoteliales están implicadas en el efecto contráctil previamente observado (Figura 6A). De forma similar, el efecto relajante que se observa en las arterias coronarias distales precontraídas con U46619 también se redujo tras la retirada del endotelio (52 ± 9% versus 27 ± 9%, p < 0.05, n=8, en ACD intactas y sin endotelio, respectivamente (Figura 6B).

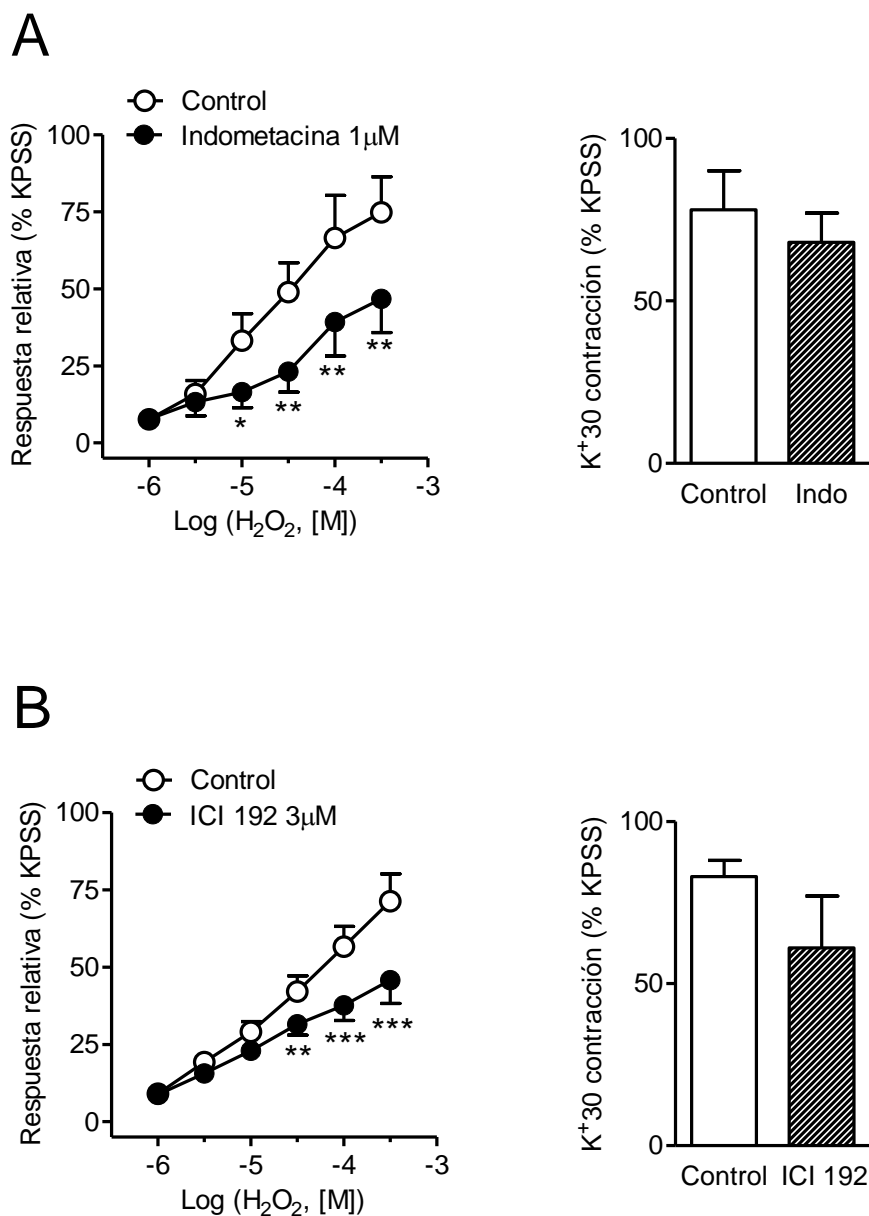


**Figura 6. Los efectos vasoactivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son dependientes del endotelio.** (A) La retirada mecánica del endotelio inhibió la respuesta contráctil al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ACP. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 6 arterias. (B) La respuesta relajante inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se vió reducida de forma significativa tras la retirada mecánica del endotelio. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por U46619 y representan la media ± ESM de 6-7 arterias. \*p< 0.05; \*\* p< 0.01.

### 2.3. Papel de la COX y del receptor TP en la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El antagonista no selectivo de la COX indometacina (1 μM), redujo de manera significativa la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias, lo que sugiere la implicación de algún agente derivado de la COX en la respuesta contráctil al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 7A). Debido a que se ha descrito la implicación del TXA<sub>2</sub> en la mediación del efecto contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en varios lechos vasculares, se determinó el efecto del antagonista selectivo del receptor TP, ICI 192 (3 μM), en los efectos vasoactivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las arterias coronarias. La incubación de los segmentos arteriales con ICI 192 redujo de manera significativa la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que sugiere que un prostanoides agonista de receptores TP derivado de la COX está implicado en la vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias (Figura 7B).

## RESULTADOS



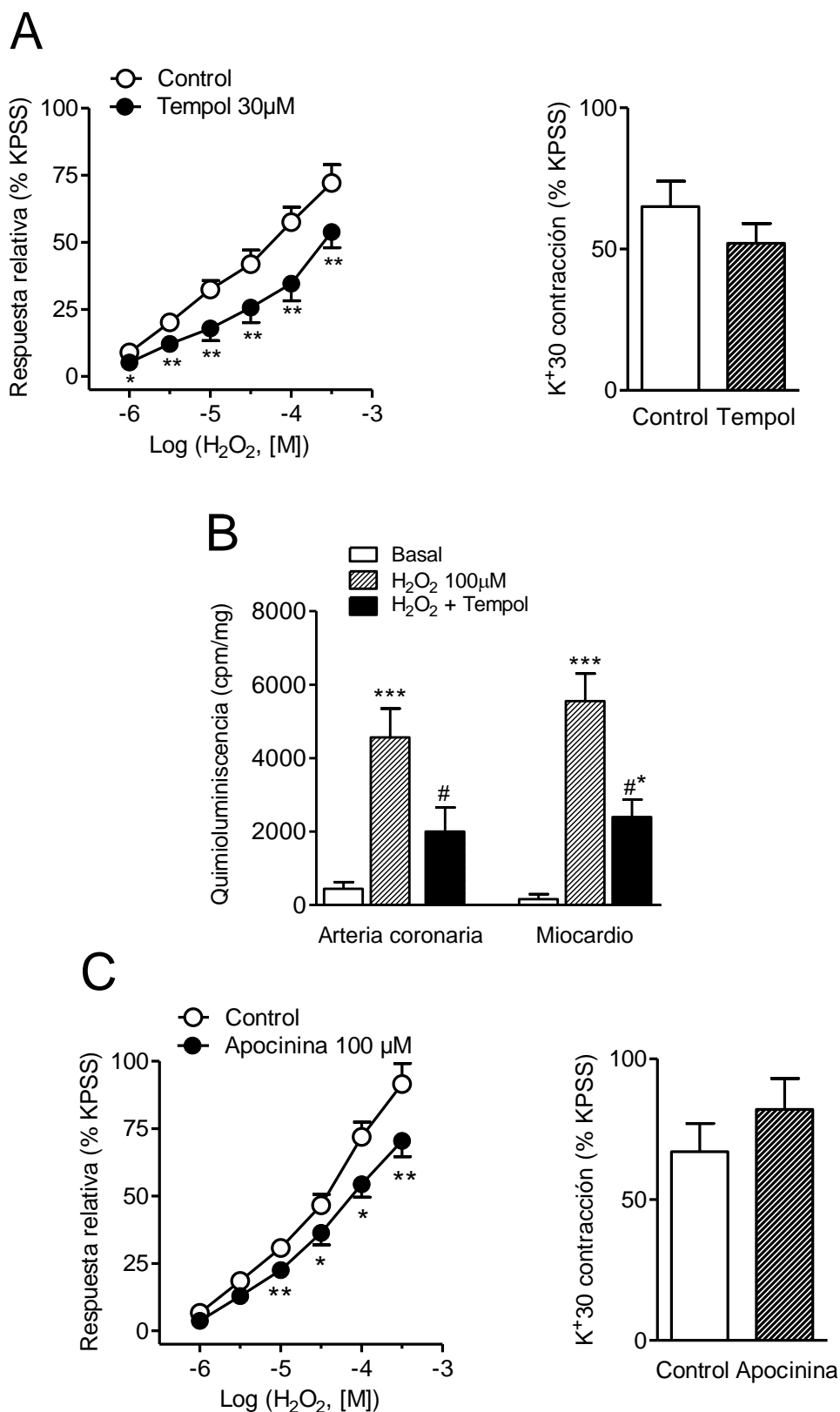
**Figura 7. El efecto contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediado por la activación de la enzima COX y del receptor TP en arterias coronarias.** (A) El inhibidor no selectivo de la COX, indometacina (1 μM) y (B) el inhibidor del receptor del TXA<sub>2</sub> ICI 192 (3 μM), redujeron de forma significativa la respuesta vasoconstrictora al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin afectar a la contracción producida por el K<sup>+</sup>30. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 7-8 arterias. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

#### 2.4. La vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediada a través de la formación de radicales superóxido

Se ha descrito que los mecanismos redox influyen las acciones vasculares del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias de resistencia. Por ello, se estudió la formación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias y en tejido miocárdico. Asimismo, también se estudió el efecto del *scavenger* de radicales libres tempol (30 μM), y del inhibidor de la NADPH oxidasa y de la formación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> apocinina (100 μM) en la vasoconstricción coronaria producida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El tempol, cuya acción mimetiza a la de la enzima SOD, produjo una reducción significativa de la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin afectar a la inducida por el K<sup>+</sup>30 (Figura 8A), lo que sugiere que la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediada por la formación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Para confirmarlo, se cuantificó la liberación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, tanto basal como estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en arterias coronarias intactas y en el miocardio adyacente, mediante el uso de técnicas de quimioluminiscencia con lucigenina. Como se puede apreciar en la Figura 8B, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementó 10 veces la liberación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> tanto en arterias coronarias intramiocárdicas como en el tejido miocárdico, incremento que se vió inhibido tras la incubación con tempol. Además, la inhibición de la NADPH oxidasa con apocinina redujo de manera significativa la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sin alterar la respuesta producida por el K<sup>+</sup>30 (Figura 8C). En conjunto, estos datos sugieren que la vasoconstricción coronaria inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> implica la formación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> derivado en parte de la NADPH oxidasa.

RESULTADOS



**Figura 8. El efecto contráctil del  $H_2O_2$  implica la generación de aniones superóxido derivados en parte de la NADPH oxidasa.** (A) El scavenger de radicales libres tempol (30  $\mu$ M) redujo de forma significativa las respuestas contráctiles al  $H_2O_2$  en arterias coronarias. (B) La producción basal de radicales  $\cdot O_2^-$  se ve aumentada por la acción del  $H_2O_2$  tanto en arterias coronarias como en el miocardio. (C) El inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina (100  $\mu$ M) atenuó la respuesta contráctil inducida por el  $H_2O_2$ . Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS (A, C) o en cuentas por minuto (cpm) por mg de tejido (B), y representan la media  $\pm$  ESM de 7-11 arterias. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs control; # $p < 0.05$  vs tratado con  $H_2O_2$ .

### **2.5. La activación de las MAPK y de la Rho quinasa están implicadas en la respuesta contráctil al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

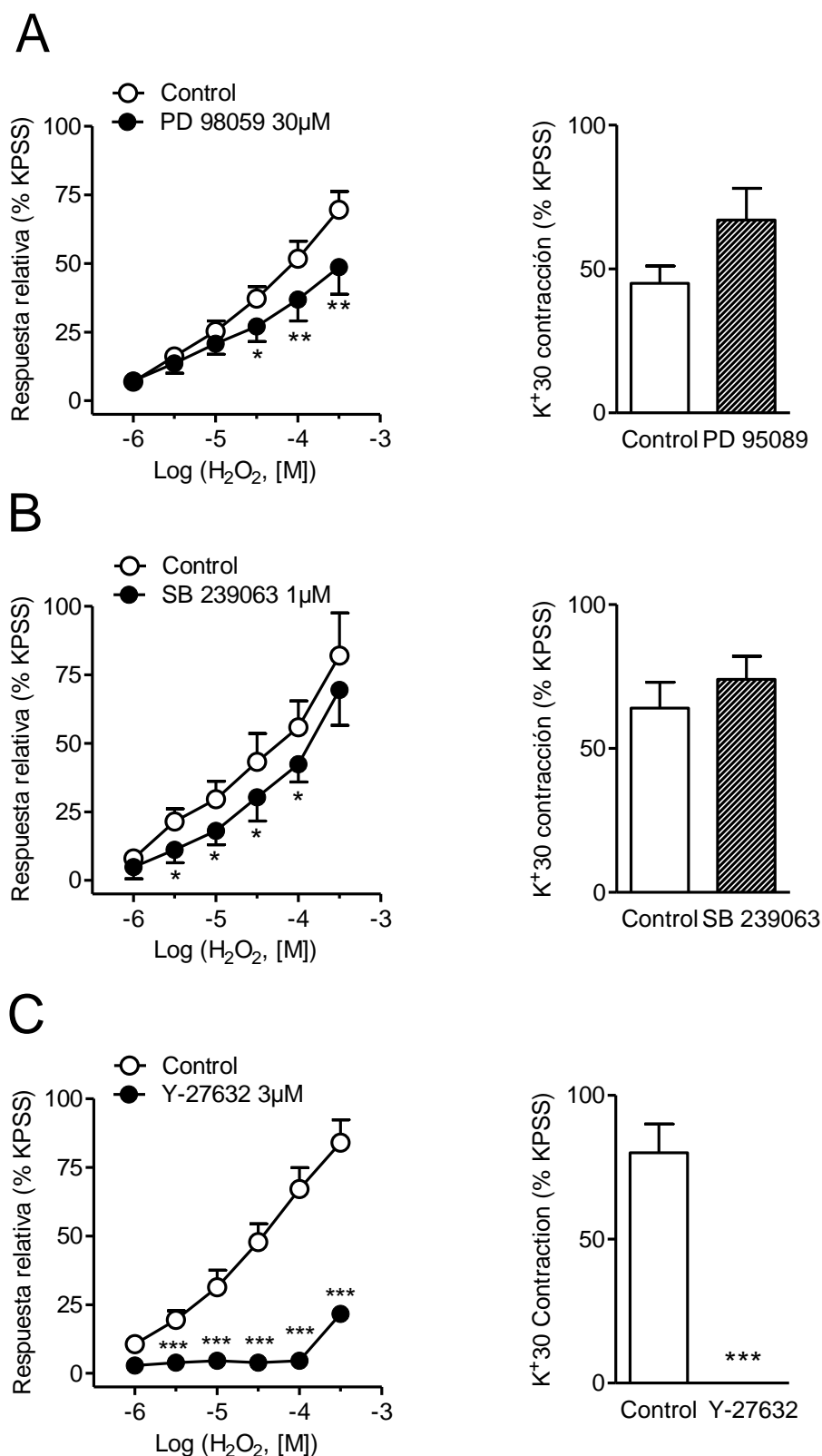
Tanto la vía de las MAPK como la de la Rho quinasa han sido propuestas como vías de señalización intracelular de la contracción vascular inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y por tanto se estudió la posible implicación de ambas vías en la vasoconstricción coronaria.

Como se puede observar en las Figuras 9A y 9B, tanto el inhibidor selectivo de la ERK MAPK PD 98059 (3 µM), como el inhibidor selectivo de la p38 MAPK SB 239063 (1 µM), redujeron de forma significativa la contracción inducida por las concentraciones más altas y más bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente, sin alterar la contracción inducida por el K<sup>+</sup><sub>30</sub> en arterias coronarias.

El inhibidor específico de la Rho quinasa Y-27632 (3 µM) inhibió la contracción inducida por el K<sup>+</sup><sub>30</sub>, en concordancia con lo descrito en otras preparaciones arteriales (Thakali et al., 2007; Villalba et al., 2008), e indujo una marcada inhibición de la contracción producida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las arterias coronarias (Figura 9C).

Estos datos son consistentes con la implicación de las vías de las MAPK y de la Rho quinasa en la vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias.

RESULTADOS



**Figura 9. Efecto de la inhibición de las MAPK y la Rho quinasa en las respuestas contráctiles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias.** (A, B) El inhibidor selectivo de la ERK MAPK, PD 98059 (30 µM), y el inhibidor de la p38 MAPK, SB239063 (1 µM), redujeron la contracción inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias sin afectar a la precontracción del K<sup>+</sup>30. (C) El inhibidor de la Rho quinasa Y-27632 (3 µM) inhibió de forma marcada las respuestas contráctiles inducidas tanto por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como por el K<sup>+</sup>30. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 5-9 arterias. \*p< 0.05; \*\*p< 0.01; \*\*\*p< 0.001.

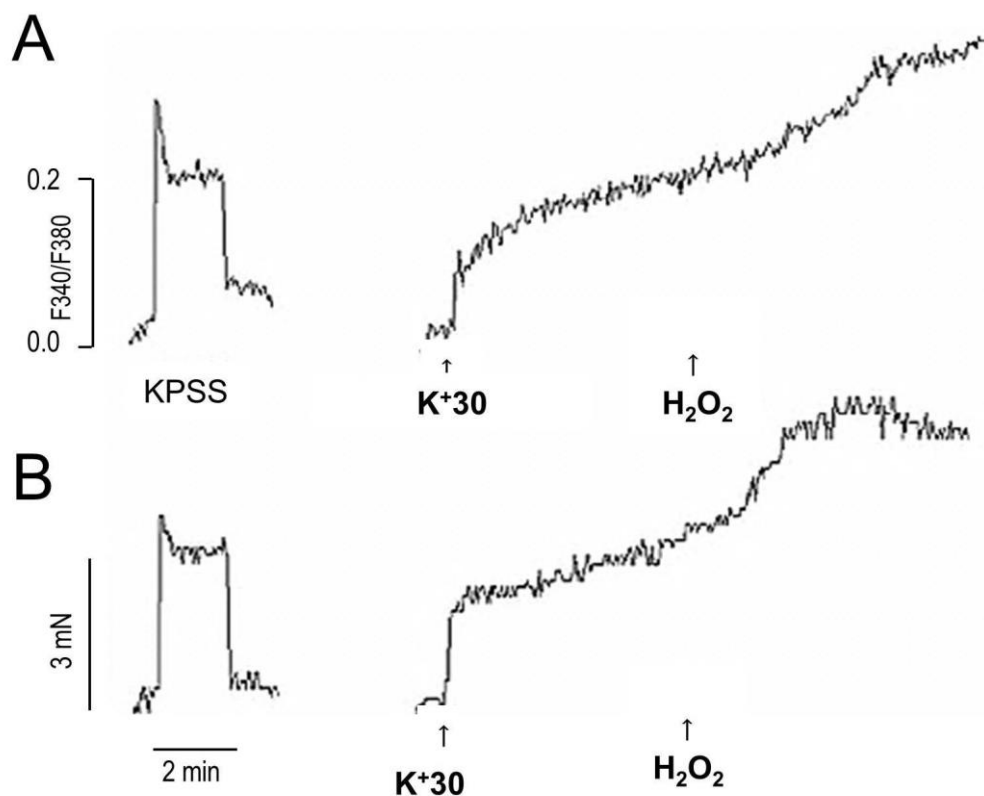
**3. SEÑALIZACIÓN DEL  $\text{Ca}^{2+}$  EN LOS EFECTOS VASOACTIVOS DEL  $\text{H}_2\text{O}_2$  EN ARTERIAS CORONARIAS**

**3.1. La vasoconstricción inducida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  está acoplada a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y no tipo L**

Se ha descrito que la contracción vascular del  $\text{H}_2\text{O}_2$  se produce tanto a través de mecanismos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como de mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ . Para determinar si la respuesta contráctil al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en arterias coronarias implica cambios en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , se procedió a realizar medidas simultáneas de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y de la tensión arterial en arterias intramiocárdicas intactas.

**3.1.1. La respuesta contráctil al  $\text{H}_2\text{O}_2$  está asociada al incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en la arteria coronaria**

La contracción de las arterias coronarias por despolarización con KPSS indujo un incremento simultáneo en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.25 \pm 0.02$ ,  $n=5$ ) y en la tensión ( $0.42 \pm 0.06 \text{ Nm}^{-1}$ ,  $n=5$ ). La estimulación de las arterias con  $\text{K}^+30$  también indujo incrementos paralelos en la tensión y en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , y la adición de una dosis única de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $10^{-4} \text{ M}$ ), indujo una vasoconstricción sostenida (Figura 10A) que se vió acompañada de un incremento simultáneo y sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , de  $72 \pm 11\%$  y  $81 \pm 11\%$ , respectivamente, de las respuestas producidas por el KPSS (Figura 10B).



**Figura 10. Efecto del  $H_2O_2$  sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión en arterias coronarias precontraídas con  $K^+30$ .** Registros simultáneos de la  $[Ca^{2+}]_i$  (A) y de la tensión (B) que muestran la respuesta inducida por el KPSS (120 mM de KCl) y por la adición exógena de una dosis única de  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) sobre arterias coronarias precontraídas con  $K^+30$ .

### 3.1.2. Los canales de $Ca^{2+}$ tipo L están asociados al aumento de $[Ca^{2+}]_i$ y de tensión inducido por $H_2O_2$

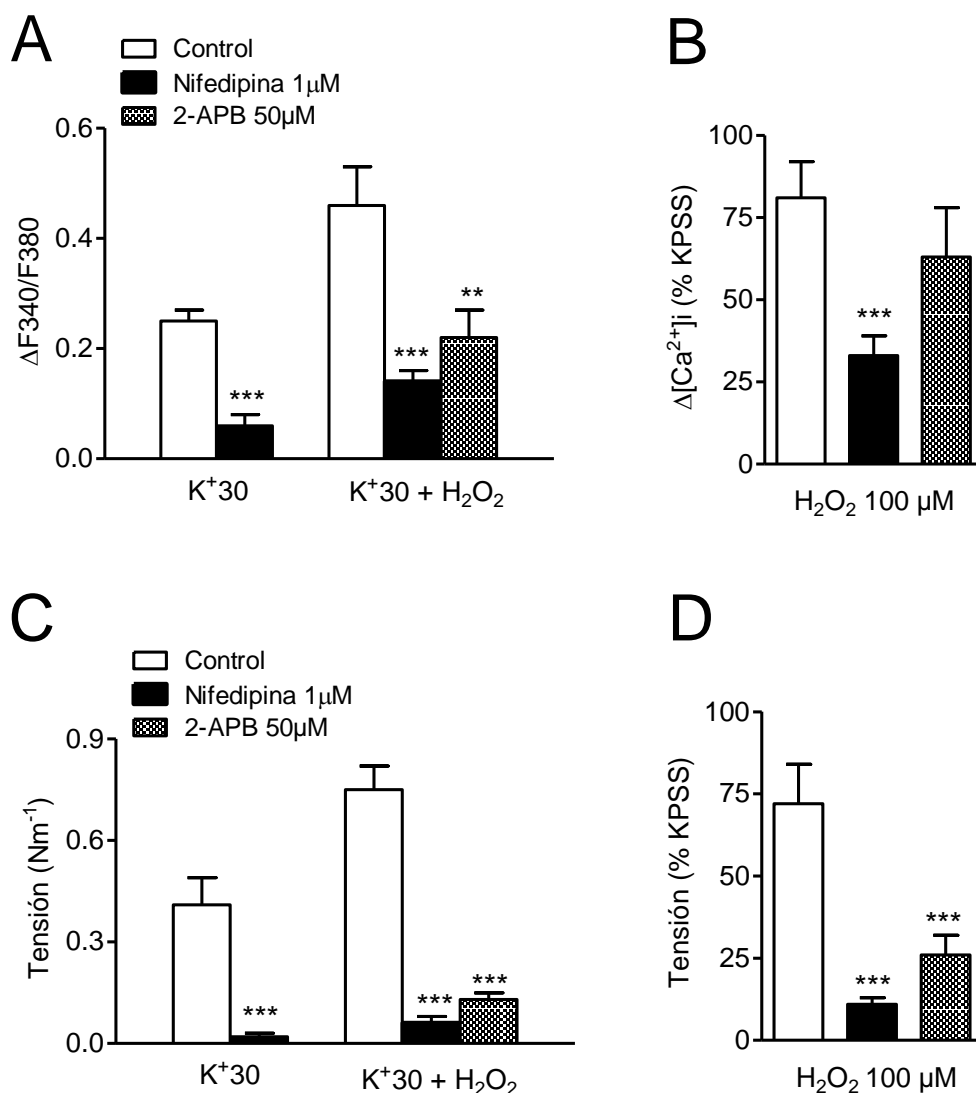
Con el fin de establecer las fuentes de movilización de  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas por  $H_2O_2$  en las arterias coronarias, se estudió el efecto del antagonista selectivo de los canales VOC tipo L, nifedipina ( $10^{-6}$  M), y del antagonista no selectivo de canales de  $Ca^{2+}$  tipo SOC, 2APB (50  $\mu$ M).

La nifedipina indujo una marcada reducción en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión basal, lo que sugiere que el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de canales tipo L está implicado en el mantenimiento del tono basal coronario. Además, la nifedipina redujo el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11A) y la tensión producida por la despolarización con  $K^+30$  (Figura 11C). También abolió casi por completo la vasoconstricción producida por el  $H_2O_2$  en arterias coronarias precontraídas con  $K^+30$  (Figura 11C, D), y redujo el incremento de la

## RESULTADOS

$[Ca^{2+}]_i$  producido por el  $H_2O_2$  a un  $33\pm 6\%$  con respecto al producido por el KPSS (Figura 11A, B).

Sin embargo, el antagonista no selectivo de los canales SOC 2APB, no redujo ni la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 11B) ni la contracción (Figura 11C) producidas por el  $H_2O_2$  resistentes a nifedipina; en cambio, se observó una tendencia al aumento en estos valores con respecto a los observados antes del tratamiento con este agente.



**Figura 11. Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (A, B) y en la tensión (C, D) en respuesta al  $H_2O_2$  y efecto de la inhibición selectiva de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (nifedipina 1  $\mu M$ ) e inhibición no selectiva de los canales de  $Ca^{2+}$  no tipo L (2APB 50  $\mu M$ ). Los resultados se expresan como valores absolutos de ratio (A, C) o como % de la contracción inducida por KPSS (B, D) y representan la media  $\pm$  ESM de 5 arterias. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .**

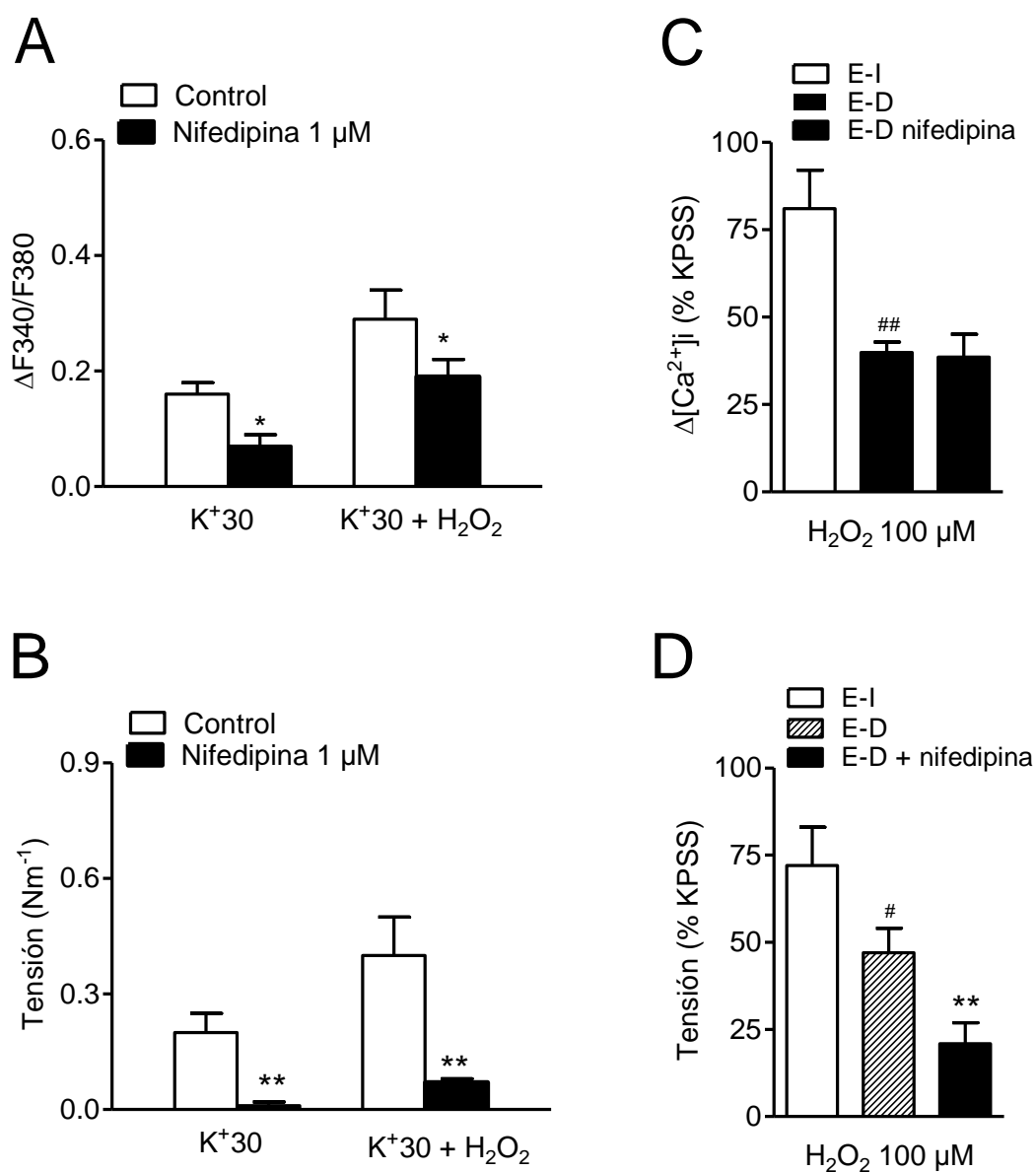
## RESULTADOS

### 3.1.3. El endotelio participa en los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la tensión inducidos por $H_2O_2$

Con el fin de determinar si el endotelio contribuye a los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión producida por el  $H_2O_2$  en arterias coronarias, se realizaron experimentos en los que el endotelio fue retirado mecánicamente. El KPSS indujo un incremento simultáneo tanto en la  $[Ca^{2+}]_i$  ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.34 \pm 0.07$ ,  $n=5$ ) como en la tensión ( $0.41 \pm 0.08 \text{ Nm}^{-1}$ ,  $n=5$ ) en arterias coronarias desprovistas de endotelio. La estimulación con  $K^+30$  también produjo incrementos paralelos en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión (Figura 12A, B), y la adición de  $H_2O_2$  produjo una vasoconstricción más marcada que se vió acompañada de un aumento simultáneo de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Figura 12A, B). Sin embargo, tanto el aumento de la tensión como el de la  $[Ca^{2+}]_i$  producidos por el  $H_2O_2$  se vió reducida significativamente en arterias coronarias sin endotelio comparado con las arterias con el endotelio intacto (Figura 12C, D). Esto sugiere que el endotelio, mediante la liberación de un agente en respuesta al  $H_2O_2$ , contribuye a los cambios en la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  y en la vasoconstricción producidas por el  $H_2O_2$  en el músculo liso coronario.

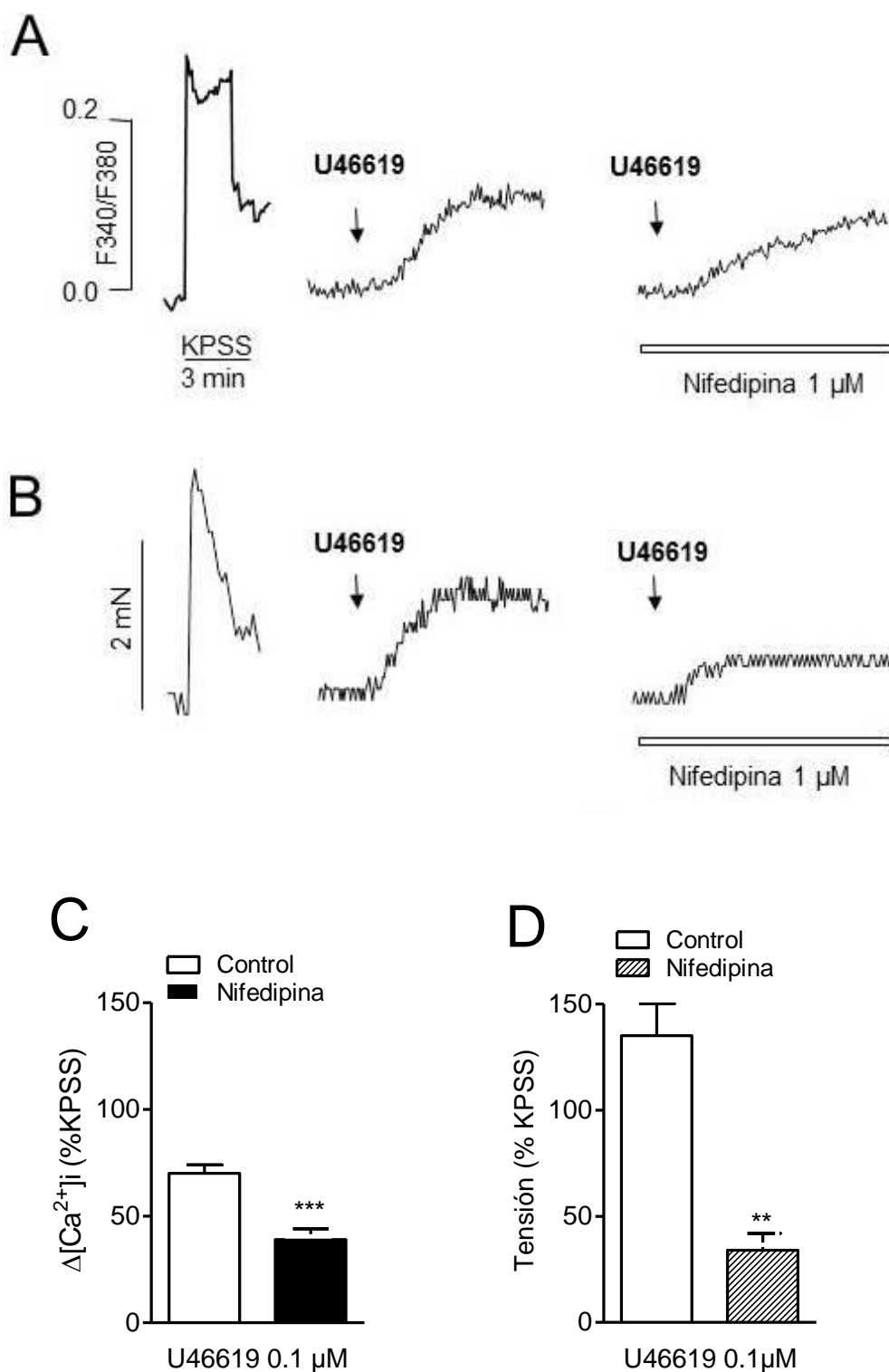
Además, mientras que el bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L redujo de forma significativa la contracción producida por el  $H_2O_2$ , el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  producido por el  $H_2O_2$  en arterias sin endotelio no se vió afectado por el bloqueo con nifedipina (Figura 12C, D).

Como parte de la contracción producida por el  $H_2O_2$  en arterias coronarias está mediada por la activación del receptor TP, se procedió a estudiar el efecto del análogo del  $TXA_2$ , U46619 ( $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ), en las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_i$  y de la tensión en arterias coronarias desprovistas de endotelio. El U46619 incrementó la  $[Ca^{2+}]_i$  en un  $70 \pm 4\%$  y la tensión en un  $135 \pm 16\%$  de las respuestas inducidas por el KPSS, y la nifedipina redujo aproximadamente a la mitad ( $39 \pm 5\%$  del KPSS) y a un tercio ( $34 \pm 8\%$  del KPSS), respectivamente, esas respuestas (Figura 13).



**Figura 12. Efecto de la retirada del endotelio sobre los cambios producidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y en la tensión en arterias coronarias precontraídas con K<sup>+</sup>30.** (A, B) Cambios inducidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A) y en la tensión (B) en arterias coronarias desprovistas de endotelio y efecto de la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L con nifedipina (1 μM). (C, D) Efecto comparativo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (C) y en la tensión (D) en arterias coronarias con el endotelio intacto (E-I) y desprovistas de endotelio (E-D), y efecto de la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L con nifedipina (1 μM). Los resultados se expresan como valores absolutos de ratio (A, B) o como % de la contracción inducida por KPSS (C, D) y representan la media ± ESM de 5-8 arterias. \*p< 0.05; \*\* p< 0.01 vs control; #p<0.05; ##p<0.01 vs tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

RESULTADOS



**Figura 13.** El incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la vasoconstricción inducida por el análogo del  $TXA_2$  se deben a la activación del canales de  $Ca^{2+}$  tipo L. (A, B) Registros simultáneos de la  $[Ca^{2+}]_i$  (A) y de la tensión (B) que muestran la respuesta inducida por el KPSS y por la adición exógena de una dosis de U46619 en arterias coronarias. (C, D) Cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  y en la tensión en respuesta al U46619 (3  $\mu$ M) y efecto de la inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L (nifedipina 1  $\mu$ M). Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media  $\pm$  ESM de 3 arterias. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.2. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> en arterias coronarias

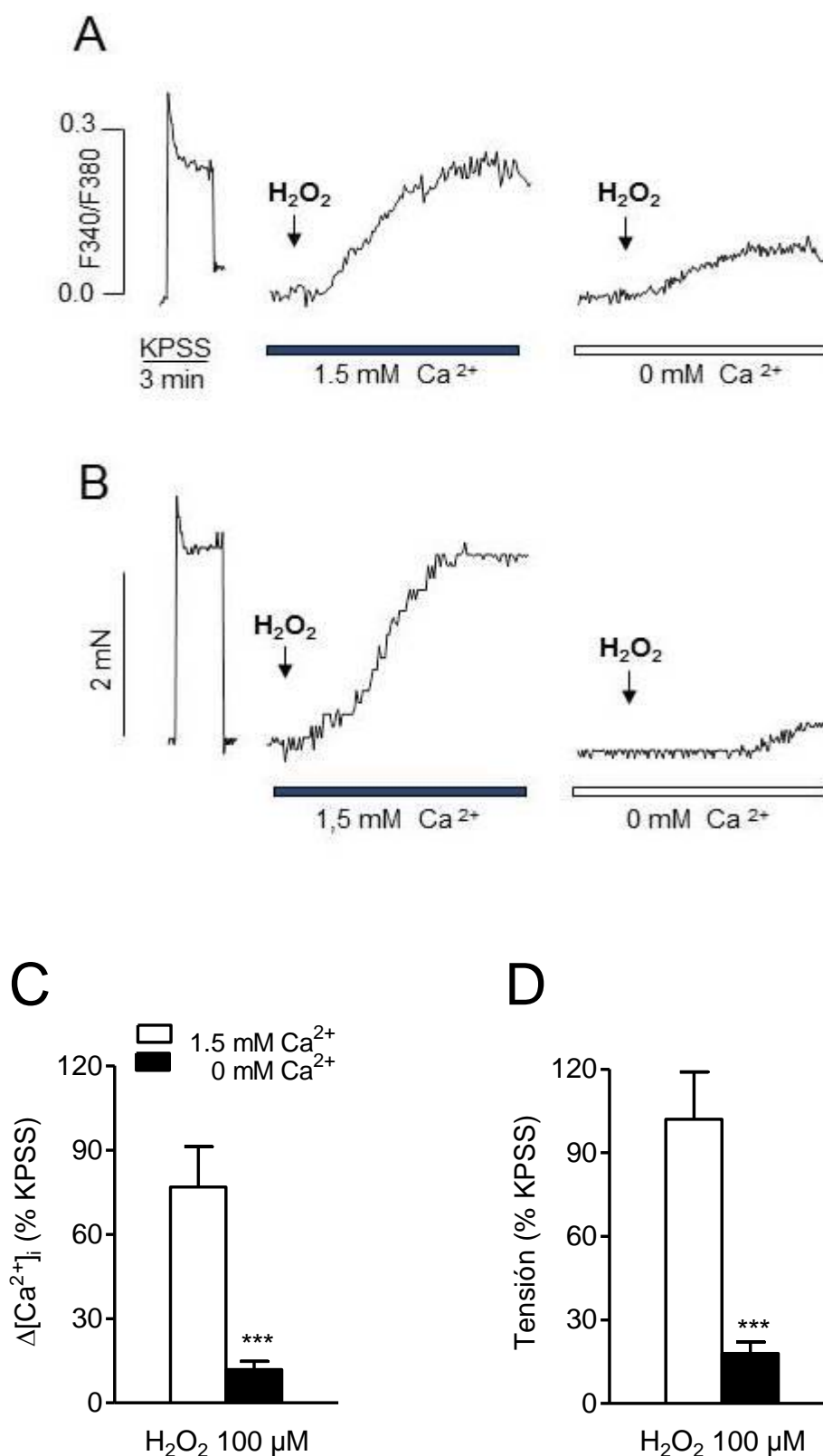
#### 3.2.1. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> moviliza Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares

Con el fin de determinar si en el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuye la movilización de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares activando así la entrada de Ca<sup>2+</sup> tipo SOC (operada por almacén o vaciamiento del retículo), las arterias coronarias fueron estimuladas con una dosis submaximal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM), en presencia y ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo una vasoconstricción sostenida ( $0.67 \pm 0.11 \text{ Nm}^{-1}$ , n=8) que se vió acompañada de un incremento simultáneo de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.33 \pm 0.06$ , n=8). Tanto el incremento en la tensión como en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se vieron marcadamente reducidos tras la retirada de Ca<sup>2+</sup> del medio extracelular, aunque una pequeña fracción del incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.05 \pm 0.01$ , n=8) y de la contracción ( $0.11 \pm 0.02 \text{ Nm}^{-1}$ , n=8) (Figura 14) persistió, lo que sugiere que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de inducir la movilización de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares.

#### 3.2.2. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa la entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> en las arterias coronarias

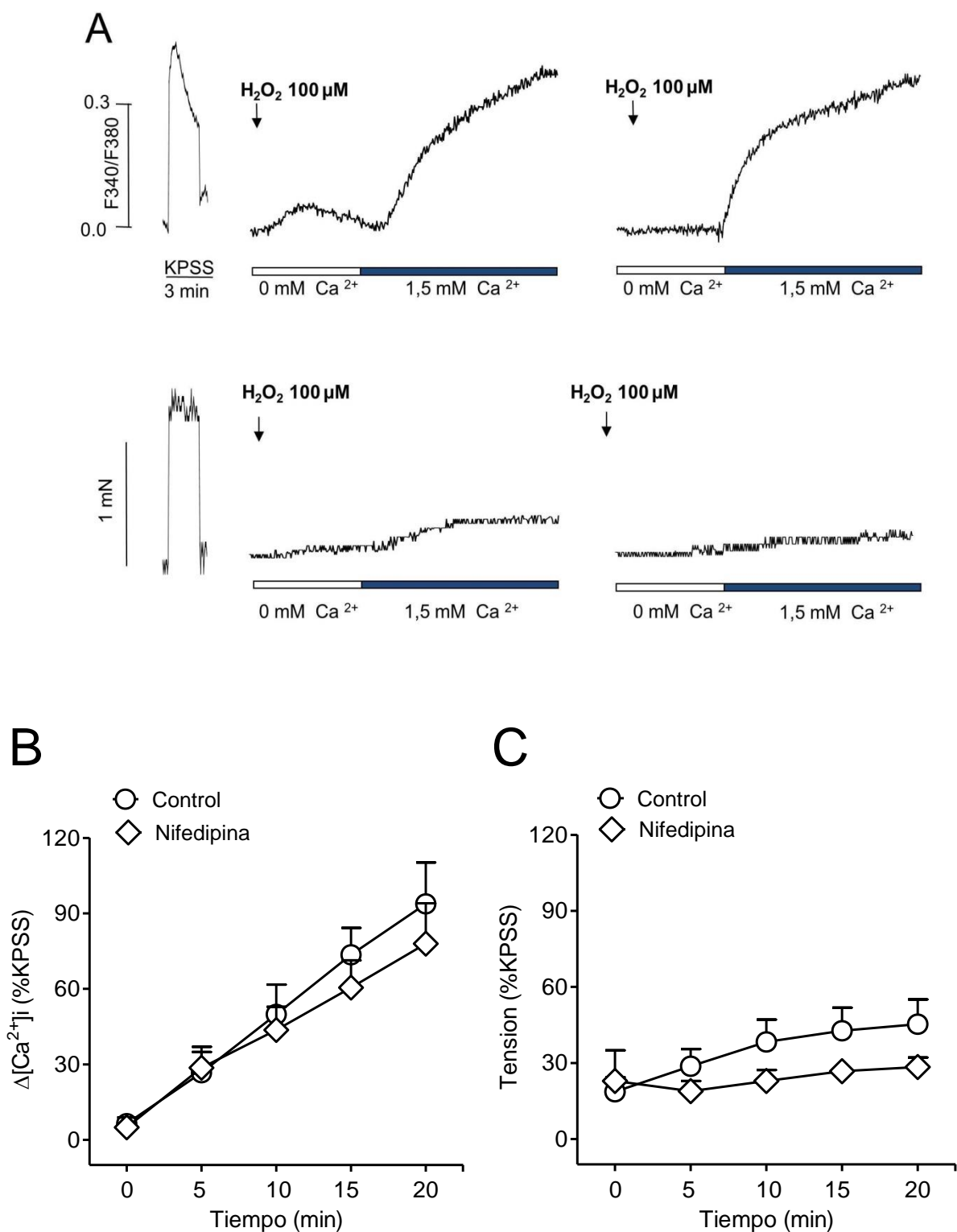
Tras la retirada del Ca<sup>2+</sup> del medio extracelular, manteniendo las arterias coronarias en PSS nominalmente libre de Ca<sup>2+</sup>, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) produjo una pequeña movilización de Ca<sup>2+</sup>, y la readición de Ca<sup>2+</sup> (1,5 mM) al medio después de 8-10 min de estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produjo un incremento marcado y sostenido de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.29 \pm 0.10$ , n=5) tras 20 minutos, de similar magnitud que el producido por la estimulación con KPSS. Sin embargo, la contracción inducida en estas condiciones se vio reducida a un tercio ( $0.29 \pm 0.07 \text{ Nm}^{-1}$ ) de la producida por KPSS. Los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  no se vieron afectados por la presencia de nifedipina (Figura 15A, B), lo que sugiere que esta entrada de Ca<sup>2+</sup> se produce a través de canales de Ca<sup>2+</sup> no dependientes de voltaje, activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La nifedipina redujo, sin embargo, la tensión producida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estas condiciones (Figura 15A, C).

RESULTADOS



**Figura 14. El incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se deben en parte a la movilización de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares. (A, B) Registros simultáneos que muestran los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A) y en la tensión (B) inducidos por KPSS y por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia y en ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular en arterias coronarias con el endotelio intacto. (C, D) Datos resumidos que muestran los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (C) y en la tensión (D) en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) en presencia y en ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular y de nifedipina (1 μM). Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 8 arterias. \*\*\*p < 0.001.**

## RESULTADOS

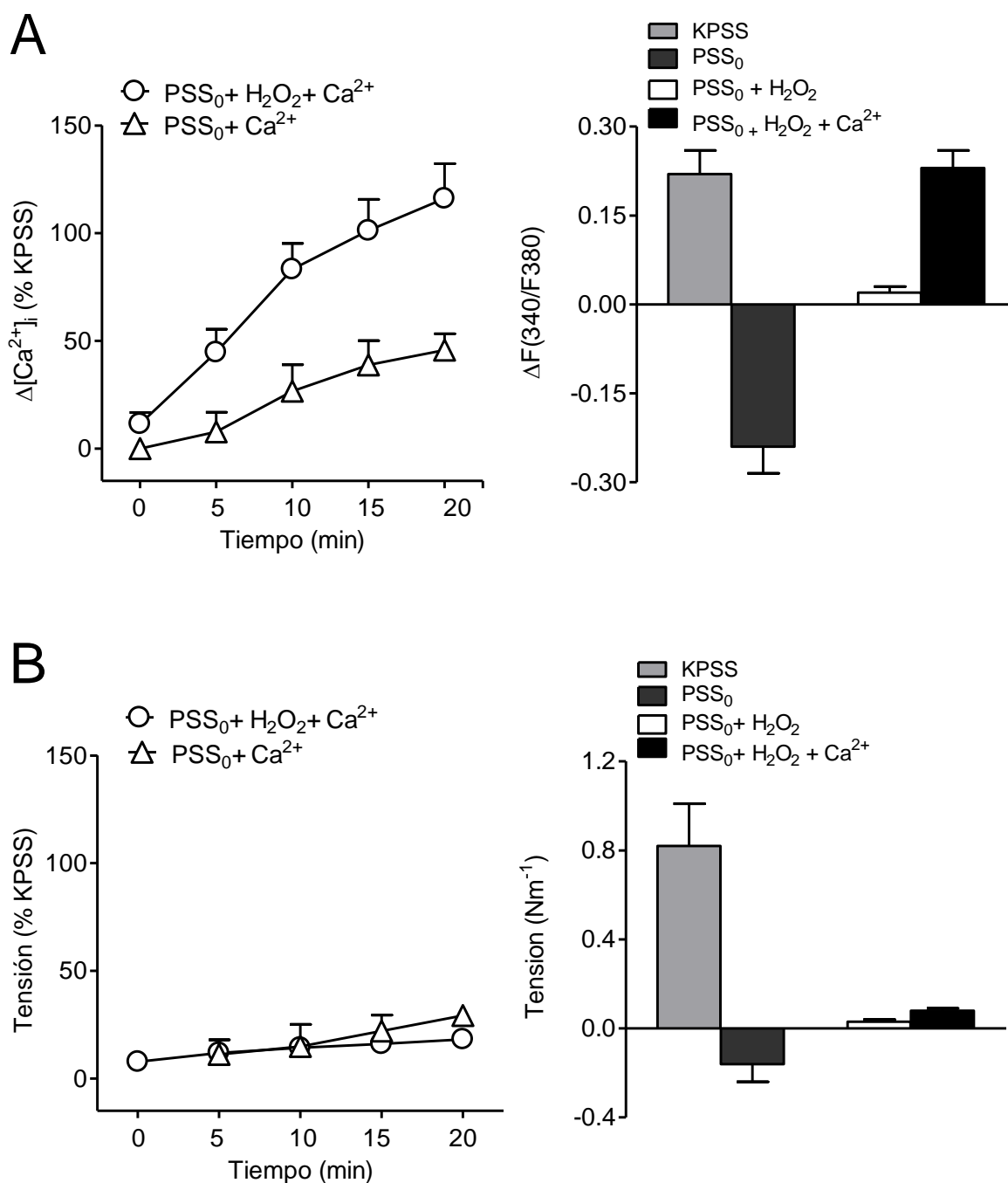


**Figura 15. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce una entrada de Ca<sup>2+</sup> resistente al bloqueo de canales VOC tipo L.** (A) Registros simultáneos de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A, arriba) y de tensión (A, abajo) que muestran el marcado incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la moderada vasoconstricción producida tras la readición de 1,5 mM de Ca<sup>2+</sup> tras la estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) en un medio libre de Ca<sup>2+</sup>, en ausencia y en presencia de nifedipina (1 μM), en arterias coronarias con el endotelio intacto. (B, C) Datos resumidos que muestran los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (B) y en la tensión (C) inducidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) en respuesta a la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 5 arterias.

### 3.2.3. Caracterización de la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ tipo SOC activada por $\text{H}_2\text{O}_2$ en el MLV coronario

Para estudiar si el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de incrementar la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso arterial coronario, se llevaron a cabo experimentos en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  en arterias coronarias en las que el endotelio fue retirado mecánicamente, en presencia de nifedipina para bloquear el efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  VOC tipo L. En estas condiciones, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  indujo una movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular produjo un incremento marcado y sostenido en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que no estuvo acompañado de incrementos significativos en la tensión (Figura 16), sugiriendo que la *entrada capacitativa* de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  no está acoplada a la contracción. La readición de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  indujo una pequeña movilización de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en arterias coronarias desprovistas de endotelio.

RESULTADOS



**Figura 16. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorece la entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> no acoplada a contracción en el MLV.** Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la entrada de Ca<sup>2+</sup> independiente de canales tipo L (A) y contracción (B) inducida por la readición de Ca<sup>2+</sup> a un medio libre de Ca<sup>2+</sup> en arterias coronarias desprovistas de endotelio y estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En presencia de nifedipina (1 μM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM), la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular produce un incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A, izquierda) similar al inducido por KPSS (A, derecha), incremento que no se ve acompañado de cambios significativos en la tensión (B). Los resultados se expresan como % del incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y la contracción inducida por KPSS (A, B izquierda) o como valores absolutos de F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub> y tensión (A, B derecha) y representan la media ± ESM de 4-9 arterias.

### 3.3. Caracterización de los canales SOC activados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 3.3.1. Efecto del vaciamiento de Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares sobre la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y sobre la tensión

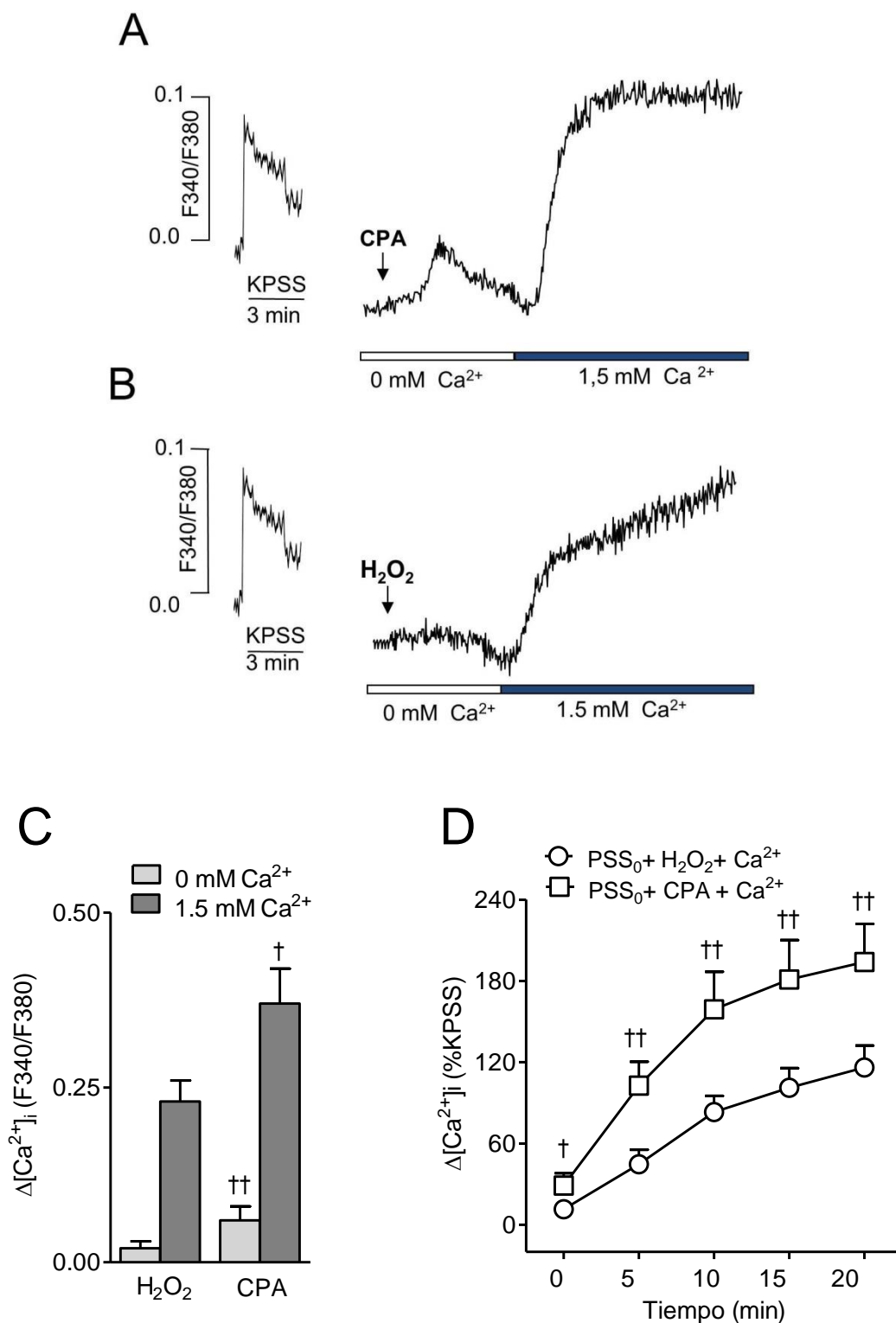
La entrada de Ca<sup>2+</sup> tipo SOC inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue comparada con la obtenida mediante la depleción pasiva de los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> por la inhibición de la SERCA con CPA (20 μM).

En arterias coronarias desprovistas de endotelio, en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> y en presencia de nifedipina, el CPA produjo un moderado incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (29 ± 9% del KPSS, n=5). Además, la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular produjo un incremento marcado en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (194 ± 28% del KPSS, n=5), que no estuvo acompañado de cambios en la tensión arterial, lo que sugiere una *entrada capacitativa* de Ca<sup>2+</sup> a través de canales tipo SOC no acoplada a contracción. En estas mismas condiciones, y cuando las arterias fueron estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular indujo un incremento de menor magnitud en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (116 ± 16% del KPSS, n=10), aproximadamente de un 50% del producido por el CPA (Figura 17).

#### 3.3.2. Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> en el músculo liso arterial coronario

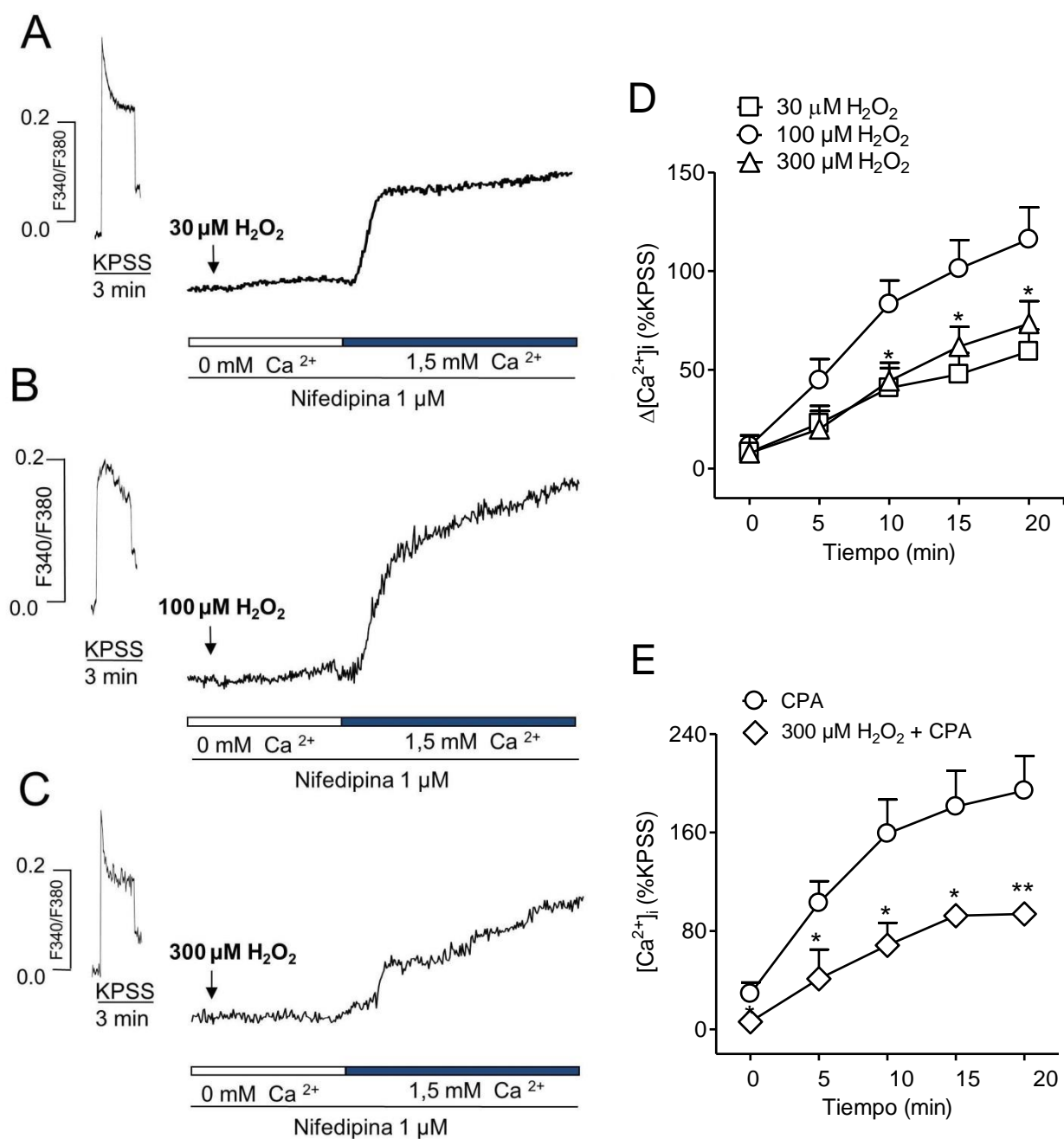
Con objeto de evaluar si el efecto producido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la entrada de Ca<sup>2+</sup> tipo SOC es dependiente de la concentración, se comparó el efecto producido por tres concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 30 μM, 100 μM y 300 μM. Mientras que a una concentración de 100 μM el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo una movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular del 116% del KPSS, la respuesta obtenida con la concentración de 30 μM fue de aproximadamente la mitad de esta respuesta (Figura 18 A, B, D). La dosis de 300 μM originó una respuesta inhibitoria en relación con el efecto de 100 μM (Figura 18C, D). Además, el tratamiento de las arterias coronarias desprovistas de endotelio con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 μM durante 30 minutos redujo a la mitad la entrada de Ca<sup>2+</sup> SOC inducida por inhibición de la SERCA con CPA (figura 18E).

## RESULTADOS



**Figura 17. Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por depósito inducida por inhibición de la SERCA y por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el MLV coronario.** (A) Registro representativo de los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducida por el inhibidor de la SERCA con CPA (20  $\mu\text{M}$ ) (A) y por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) (B) en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y en respuesta a la readdición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular. (C) Efectos medios comparativos del CPA y del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y tras la readdición de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio. (D) Cambios tiempo-dependientes medios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a la readdición de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de CPA y de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media  $\pm$  ESM de 4-10 arterias. †<math><0.05</math>, ††<math><0.01</math>, vs  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

RESULTADOS



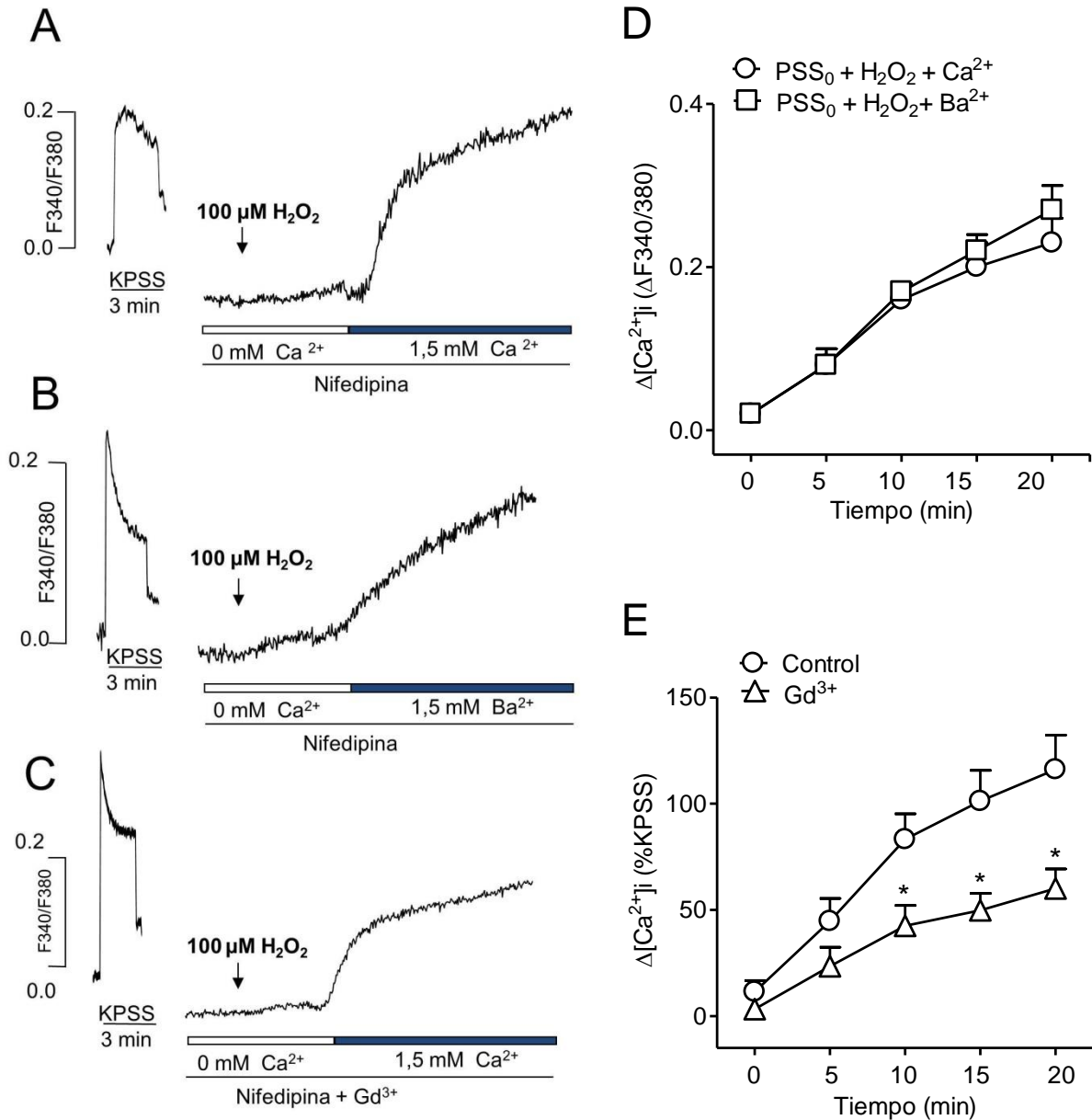
**Figura 18. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene un efecto dual concentración-dependiente en la entrada de Ca<sup>2+</sup> no tipo L en el MLV coronario.** (A, B, C) Registros que muestran el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> producido por la readición de Ca<sup>2+</sup> (1,5 mM) al medio extracelular tras la estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM (A), 100 μM (B) o 300 μM (C) en arterias coronarias desprovistas de endotelio. (D) Valores medios de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en respuesta a la readición de Ca<sup>2+</sup> (1,5 mM) al medio extracelular en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 μM, 100 μM y 300 μM. (E) Valores medios de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en respuesta a la readición de Ca<sup>2+</sup> (1,5 mM) al medio extracelular en presencia de CPA (20 μM), en condiciones controladas y tras 30 minutos de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 300 μM. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 3-9 arterias. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs control.

### 3.3.3. Los canales no selectivos de cationes intervienen en la entrada capacitativa de $\text{Ca}^{2+}$ inducida por $\text{H}_2\text{O}_2$

La contribución de los canales no selectivos de cationes a la entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  se evaluó utilizando fluorimetría de  $\text{Ba}^{2+}$  en lugar de fluorimetría de  $\text{Ca}^{2+}$ , con el fin de investigar el influjo de cationes divalentes activado por el tratamiento con peróxido, sin la intervención de los mecanismos de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  ni de los depósitos intracelulares (Villalba et al., 2008). El  $\text{Ba}^{2+}$  es un catión divalente con mayor afinidad que el  $\text{Ca}^{2+}$  por el FURA. Además, a diferencia del  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Ba}^{2+}$  no es expulsado del interior celular por bombas de membrana ni es incorporado a los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de ATPasas (Inoue et al., 2001), siendo los canales no selectivos de cationes tan permeables al  $\text{Ba}^{2+}$  como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Parekh y Penner, 1997).

En arterias coronarias desprovistas de endotelio, en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y en condiciones de bloqueo de los canales tipo L con nifedipina y estimuladas con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la adición de  $\text{Ba}^{2+}$  (1,5 mM) incrementó el ratio de FURA-2 AM de forma similar al incremento inducido por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 19A, B, D). La incubación de las arterias coronarias desprovistas de endotelio en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  con el bloqueante no selectivo de canales de cationes, gadolinio (50  $\mu\text{M}$ ), redujo de forma significativa el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  tras la readición al medio extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 19C, E). Estos resultados sugieren la participación de canales de cationes no selectivos en la *entrada capacitativa* de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el MLV coronario de la rata.

RESULTADOS



**Figura 19. La entrada de  $Ca^{2+}$  no tipo L inducida por  $H_2O_2$  está mediada por canales no selectivos de cationes.** (A, B, C) Registros representativos que muestran (A) el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por  $H_2O_2$  100  $\mu M$  en un medio libre de  $Ca^{2+}$  tras la readición de  $Ca^{2+}$  al medio; (B) el incremento en la fluorescencia de Fura-2 AM en arterias coronarias desprovistas de endotelio tras la readición de  $Ba^{2+}$  1,5 mM; y (C) el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por  $H_2O_2$  100  $\mu M$  en un medio libre de  $Ca^{2+}$  tras la readición de  $Ca^{2+}$ , después de tratar las arterias coronarias con  $Gd^{3+}$  (50  $\mu M$ ). (D) Valores medios de los cambios en  $F_{340}/F_{380}$  en respuesta a la adición de  $Ba^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  en arterias coronarias activadas con  $H_2O_2$  100  $\mu M$  en un medio libre de  $Ca^{2+}$  (E) Valores medios de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta al  $H_2O_2$  en presencia y en ausencia del bloqueante no selectivo de canales de cationes,  $Gd^{3+}$  (50  $\mu M$ ). Los resultados se expresan como valores absolutos de ratio (D) o como % de la contracción inducida por KPSS (E) y representan la media  $\pm$  ESM de 3 arterias. \* $p < 0.05$  vs control.

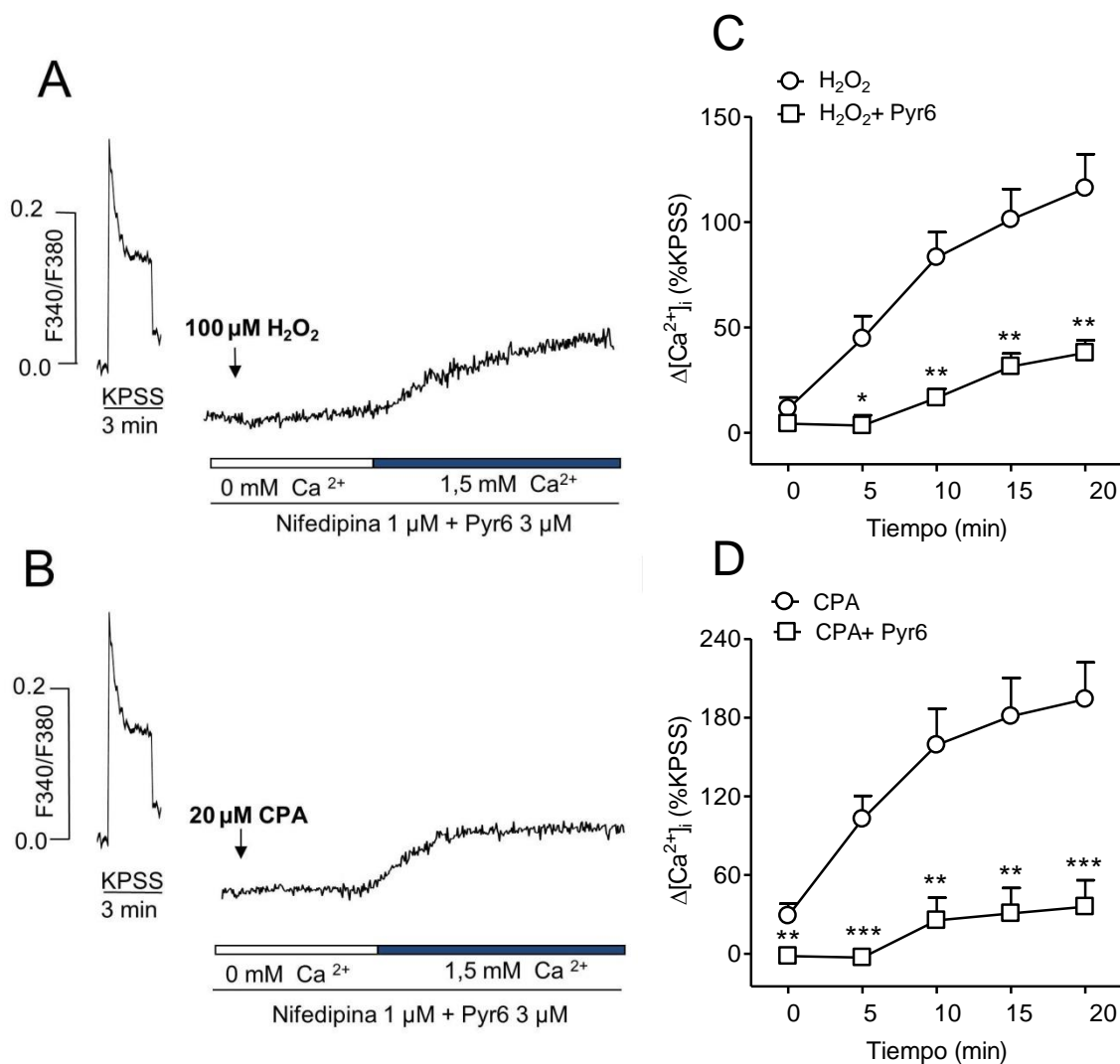
### 3.3.4. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la entrada de Ca<sup>2+</sup> mediada por Orai1 en el MLV coronario

Con el fin de determinar el papel de los canales CRAC en la entrada de Ca<sup>2+</sup> no acoplada a contracción inducida por CPA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se estudió el efecto del CPA y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias pretratadas con el nuevo inhibidor selectivo de la entrada de Ca<sup>2+</sup> SOC mediada por Orai1, Pyr 6 (3 μM). La incubación de las arterias coronarias con Pyr6, redujo a un tercio en el caso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 20A) y a un quinto en el caso del CPA (Figura 20B) el incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> producido tras la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular.

### 3.3.5. Efectos de la oxidación de grupos tiol en la entrada de Ca<sup>2+</sup> SOC mediada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el MLV coronario

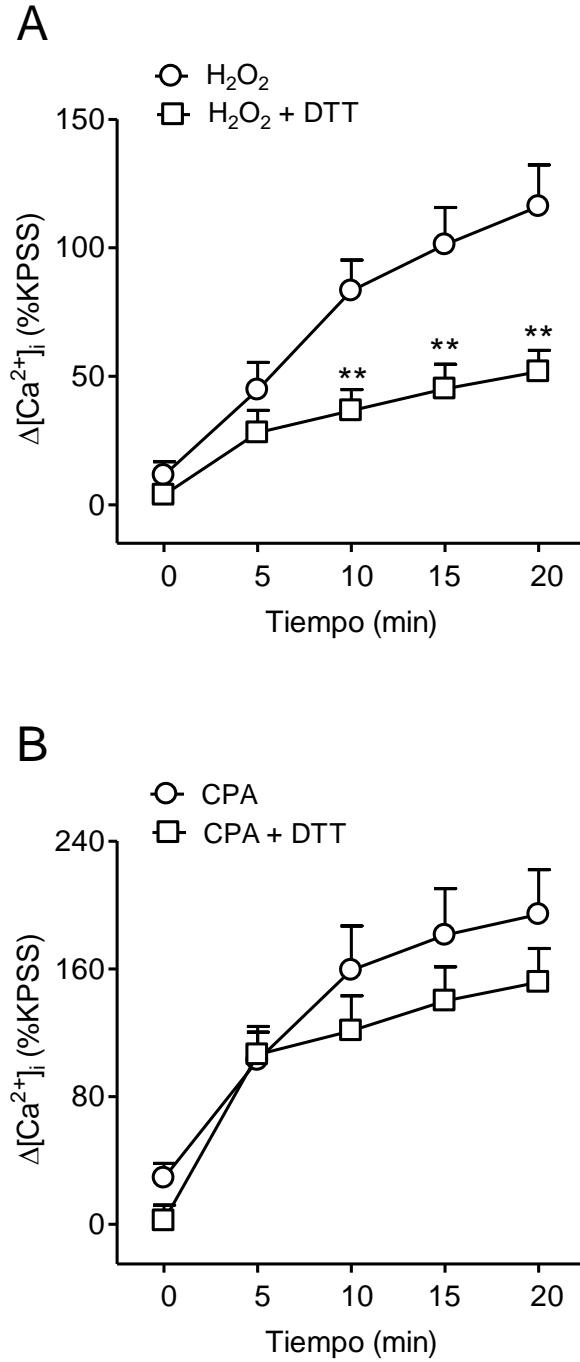
El tratamiento de arterias coronarias desprovistas de endotelio con el agente reductor específico de grupos tiol, DTT (0,1 mM), indujo una marcada inhibición de la entrada de Ca<sup>2+</sup> no dependiente de voltaje estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, produjo una reducción no significativa de la entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por la inhibición de la SERCA con CPA. En conjunto, estos resultados sugieren que la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la entrada SOC se debe a la oxidación de grupos tiol del MLV coronario (Figura 21).

RESULTADOS



**Figura 20. La entrada de calcio tipo SOC inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es inhibida por el bloqueante selectivo de la entrada de Ca<sup>2+</sup> mediada por Orai1, Pyr6.** (A, B) Registros representativos de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) y por CPA (B) en presencia de Pyr 6 (3 μM), en respuesta a la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular. (C, D) Valores medios de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) (C) y CPA (20 μM) (D) en respuesta a la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular en presencia y en ausencia de Pyr6 (3 μM) en arterias coronarias. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 4 arterias. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs control.

RESULTADOS



**Figura 21. La entrada de Ca<sup>2+</sup> tipo SOC inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediada por oxidación de grupos tiol.** Valores medios de los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (arriba) y por CPA (abajo) en respuesta a la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular en presencia y en ausencia del agente reductor específico de grupos tiol, DTT (100 μM) en arterias coronarias. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 4-9 arterias. \*\*p<0.01 vs control.

#### **4. EFECTOS VASOACTIVOS DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN ARTERIAS CORONARIAS EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO**

Debido que se ha descrito que la producción incrementada de ROS en la pared vascular está implicada en la disfunción arterial que se produce en el curso de enfermedades vasculares, los efectos vasoactivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron evaluados en arterias coronarias de RZO, modelo de obesidad genética/ SM.

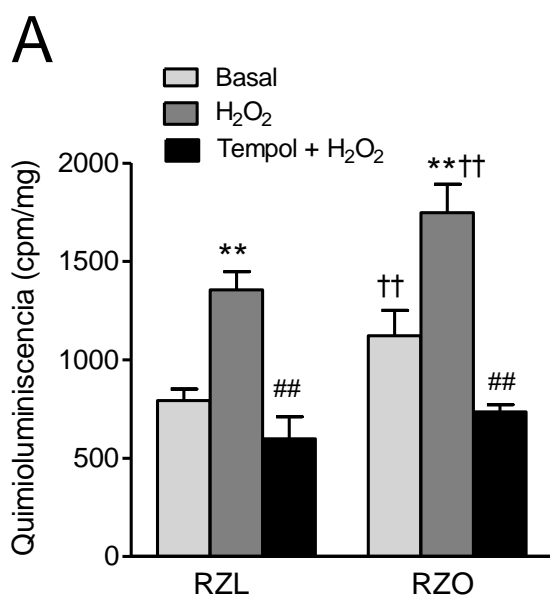
##### **4.1. Determinación de la producción de ROS en arterias coronarias y miocardio en condiciones de Síndrome Metabólico**

Con el fin de determinar si existe una producción incrementada de ROS en condiciones de SM en el corazón, estando por tanto sometido a un mayor nivel de estrés oxidativo, se determinó la producción de aniones  $\cdot\text{O}_2^-$  en arterias coronarias y en miocardio de RZL y RZO. En animales obesos, en comparación con sus respectivos controles, la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  fue significativamente mayor tanto en condiciones basales como tras la estimulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto en las muestras de arterias coronarias como en las muestras de tejido miocárdico (Figura 22). Tras la incubación de ambos tejidos con tempol, la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  se vio marcadamente disminuida, tanto en miocardio como en arterias coronarias, reduciéndose a valores similares en animales obesos y en sus controles.

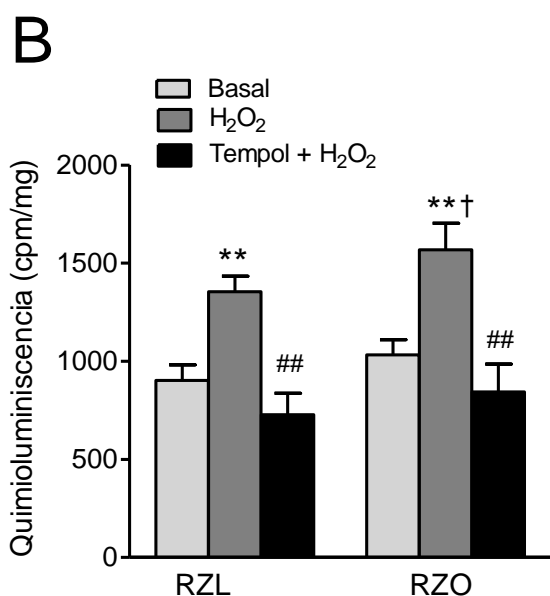
##### **4.2. Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias precontraídas con agonistas y en arterias coronarias y mesentéricas precontraídas con K<sup>+</sup>30**

Al exponer las arterias coronarias a la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se observaron diferencias significativas entre el efecto vasoconstrictor producido por este agente, ni en arterias precontraídas con 5-HT (Figura 23A), ni en arterias coronarias precontraídas con K<sup>+</sup>30 (Figura 23B) entre animales control y animales con SM. Asimismo, este efecto fue similar en arterias mesentéricas, donde tampoco se apreciaron diferencias significativas en la contracción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en RZL y RZO (Figura 23C).

*Arteria Coronaria*

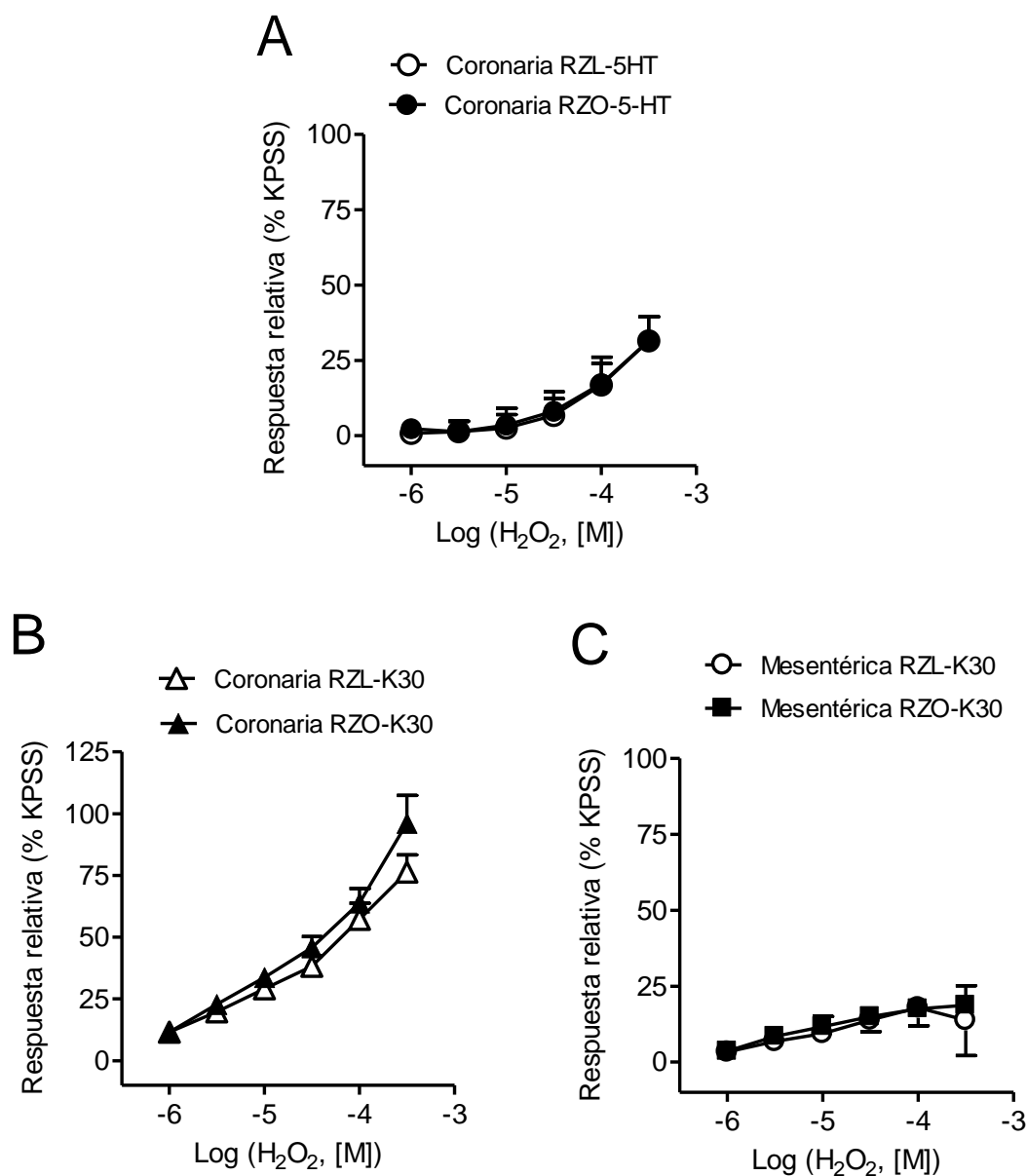


*Miocardio*



**Figura 22. La formación de radicales superóxido basal y estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está incrementada en condiciones de Síndrome Metabólico.** Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) y del scavenger de radicales libres tempol (30 μM), en la producción de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> en RZO y en RZL, en arterias coronarias (A) y en el miocardio (B). Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm) por mg de tejido y representan la media ± ESM de 8-20 animales. \*\*p<0.01 vs control antes de tratamiento; ##p<0.01 vs tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; †p<0.05, ††p<0.01 vs LZR.

## RESULTADOS



**Figura 23. Efectos vasoactivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias y mesentéricas de RZL y RZO.** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un efecto contráctil de similar magnitud en arterias de RZO y RZL en arterias coronarias (A, B) precontraídas con 5-HT (A) y K<sup>+</sup>30 (B) y en arterias mesentéricas precontraídas con K<sup>+</sup>30 (C). Los resultados se expresan como media ± ESM de 4-7 arterias.

### 4.3. Mecanismos vasoactivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y vías de señalización de Ca<sup>2+</sup> en arterias coronarias bajo condiciones de Síndrome Metabólico

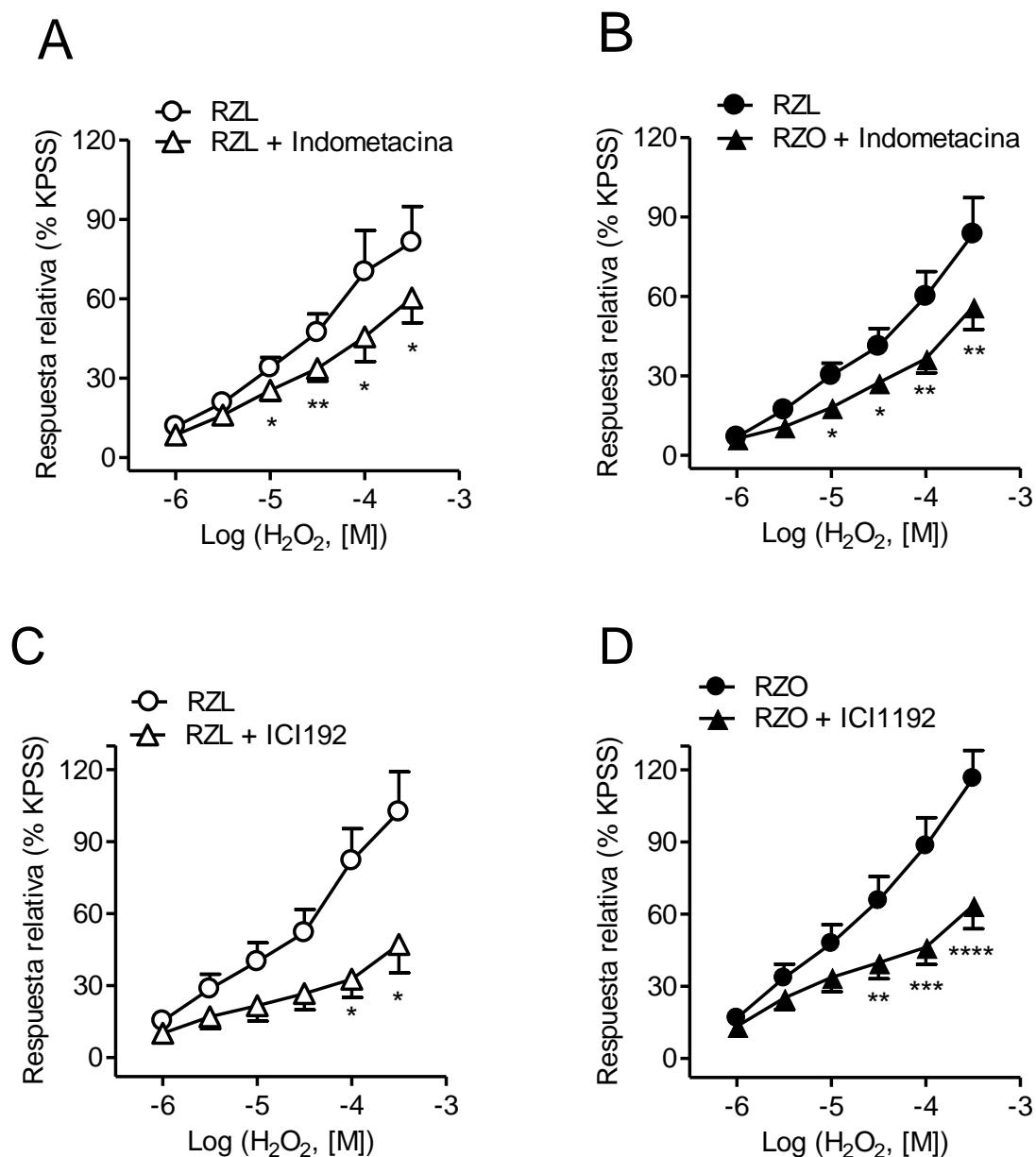
#### 4.3.1. Papel de la COX y del receptor TP en el efecto contráctil inducido por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Con el fin de determinar la implicación de los prostanoideos sobre la respuesta contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias en condiciones de SM, se llevaron a cabo CCR en ausencia y en presencia de indometacina, inhibidor no selectivo de la COX, y de ICI 192, antagonista selectivo del receptor TP. La inhibición de la enzima COX redujo de forma significativa, y en similar proporción, el efecto contráctil inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias de RZL y RZO (Figura 24 A, B). Asimismo, el ICI 192 también inhibió la vasoconstricción inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de forma similar en RZL y RZO, y en una proporción mayor que la producida por la indometacina (Figura 24 C, D). Estos resultados sugieren que efecto contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediado por la activación de la COX y la liberación de prostanoideos contráctiles que actúan sobre el receptor TP tanto en RZL como en RZO.

#### 4.3.2. Papel del Ca<sup>2+</sup> en la vasoconstricción inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el músculo liso vascular coronario en condiciones de Síndrome Metabólico

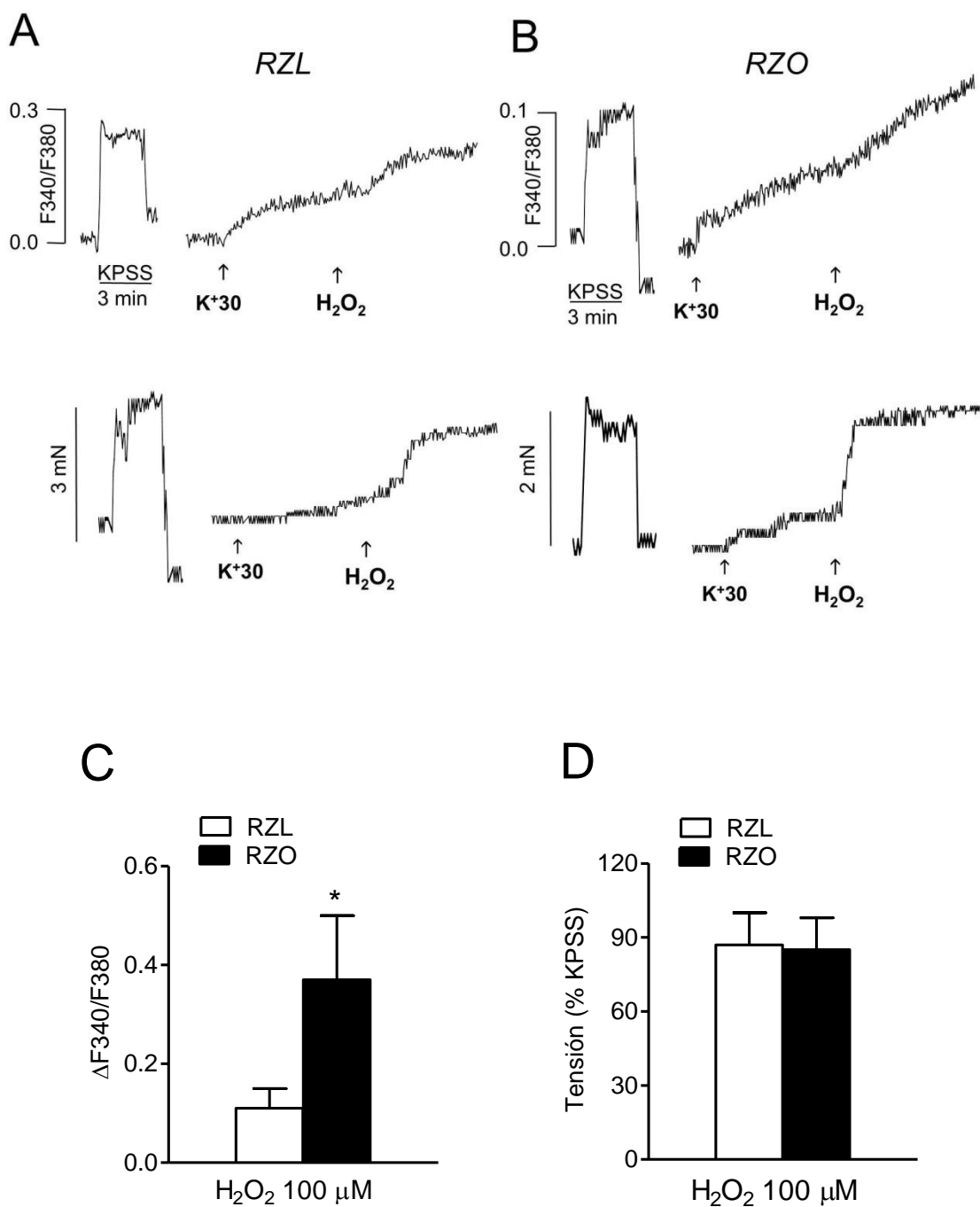
En arterias coronarias con endotelio intacto precontraídas con K<sup>+</sup>30, la estimulación con una dosis única de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indujo incrementos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, significativamente mayores en RZO que en RZL ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.10 \pm 0.04$ , n=6 en RZL y  $0.37 \pm 0.14$ , n=6 en RZO, p<0,05 vs RZL) (Figura 25 A, C). Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, la vasoconstricción coronaria inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue similar en ambos tipos de animales ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.52 \pm 0.11$ , n=6 en RZL y  $0.52 \pm 0.2$ , n=4 en RZO) (Figura 25 B, D).

En arterias coronarias desprovistas de endotelio procedentes de animales con SM, el antagonista selectivo del receptor TP, ICI 192, no modificó el incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.10 \pm 0.04$ , n=4 vs  $0.13 \pm 0.06$ , n=4 en presencia de ICI 192) ni en la tensión inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 26).



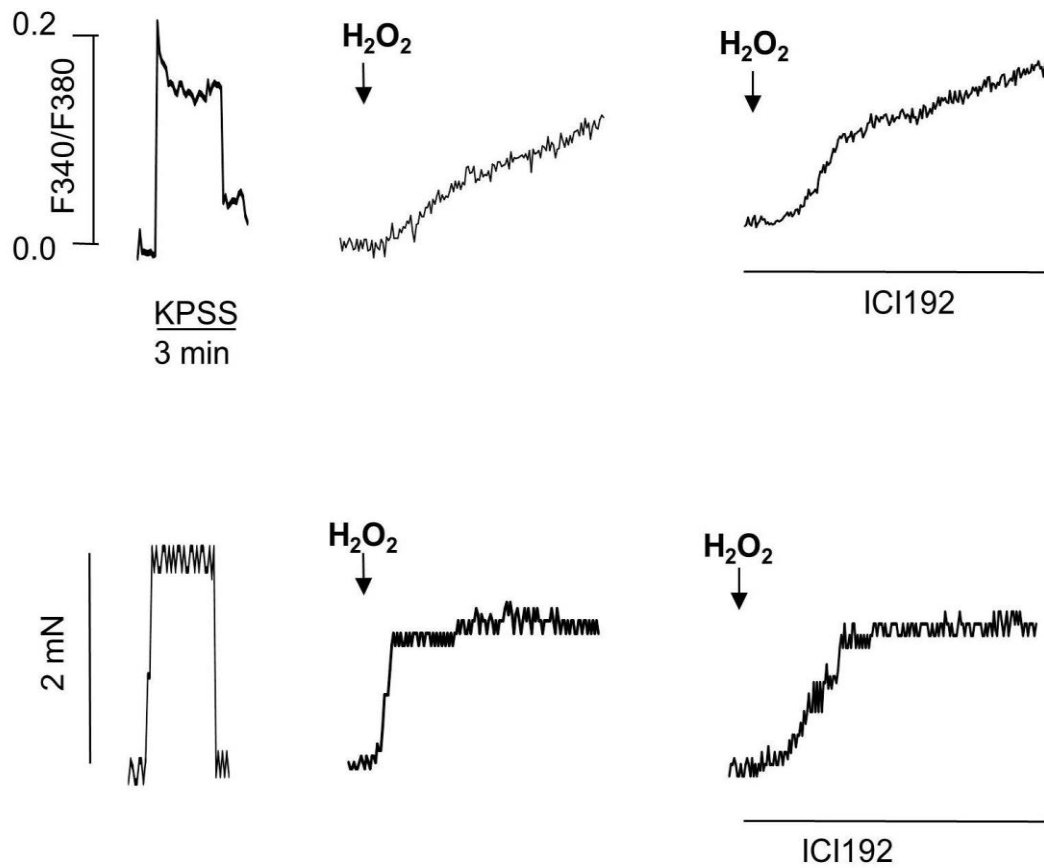
**Figura 24. La vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediada por la activación de la COX y del receptor TP en arterias coronarias de RZL y RZO.** (A, B) El inhibidor no selectivo de la COX, indometacina (1 μM), disminuyó significativamente la respuesta contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias de RZL y RZO. (C, D) El inhibidor del receptor TP, ICI 192 (3 μM), redujo de forma significativa la respuesta vasoconstrictora al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en RZL y RZO. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 6-7 arterias. \*p< 0.05; \*\* p< 0.01; \*\*\*p< 0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

RESULTADOS



**Figura 25. Cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y en la tensión en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZL y RZO.** (A, B) Registros simultáneos de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (A, B superior) y de la tensión (A, B inferior) que muestran el efecto de una dosis única de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) sobre arterias coronarias de RZL (A) y RZO (B) precontraídas con K<sup>+</sup>30. (C, D) Datos resumidos de los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los incrementos en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (C) y tensión (D) en arterias de RZL y RZO. Los datos se expresan como valores absolutos de ratio (C) o como % de la contracción inducida por KPSS (D) y representan la media ± ESM de 3-5 arterias. \*p < 0.05.

## RESULTADOS



**Figura 26. Efecto de la inhibición del receptor TP sobre el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión en respuesta al  $H_2O_2$  en arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZO.** Registros simultáneos que muestran los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (A, arriba) y en la tensión (A, abajo) inducidos por  $H_2O_2$  en presencia y en ausencia de ICI 192 ( $3 \mu M$ ) en arterias coronarias de RZO.

#### 4.4. Papel de la COX-2 y de los radicales $\cdot\text{O}_2^-$ en los efectos vasoactivos del $\text{H}_2\text{O}_2$ en arterias coronarias en condiciones de Síndrome Metabólico

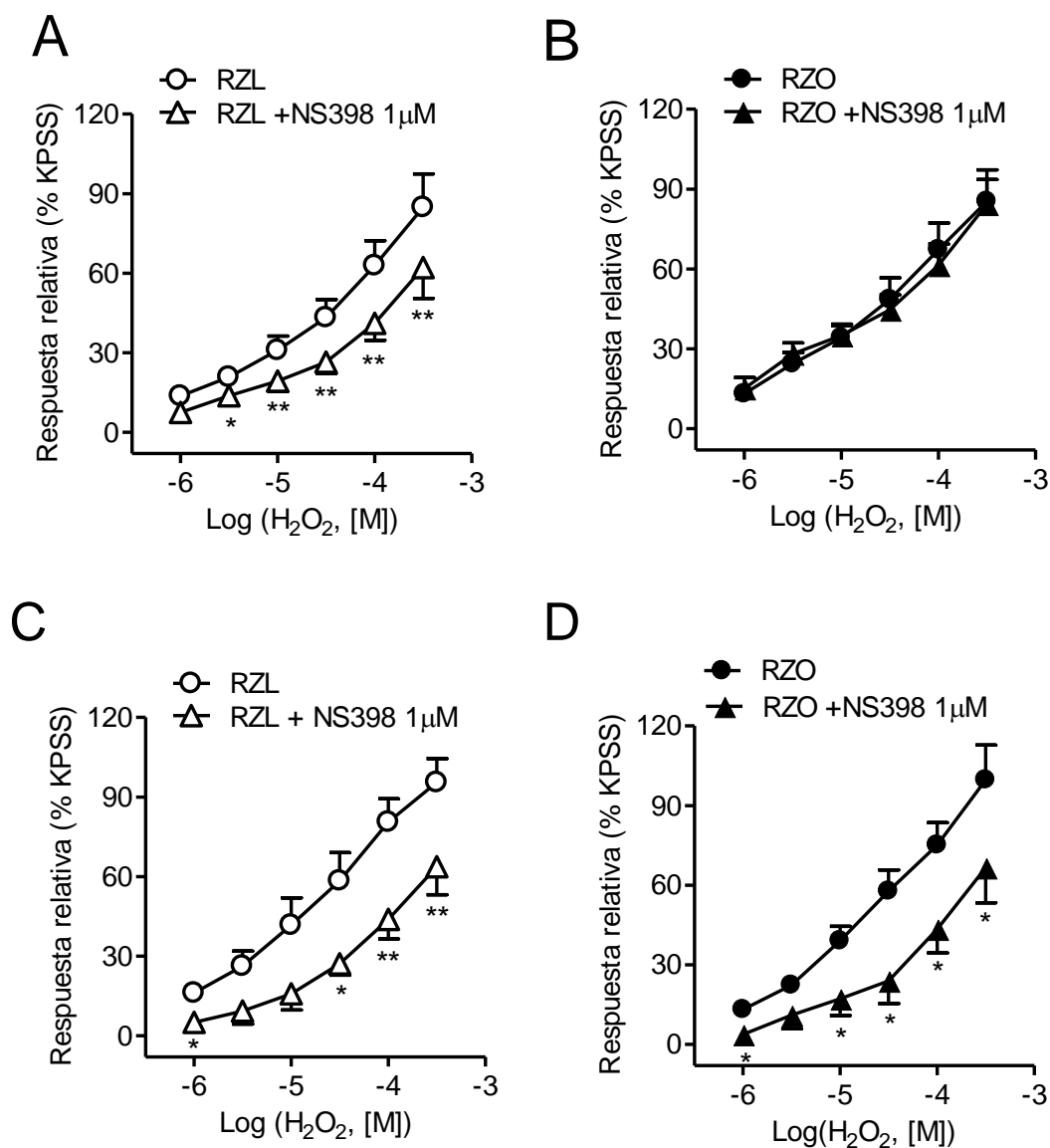
##### 4.4.1. Papel de la COX-2 en el efecto contráctil inducido por el $\text{H}_2\text{O}_2$

El antagonista selectivo de la COX-2, NS 398, redujo de forma significativa la vasoconstricción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en arterias coronarias de RZL con el endotelio intacto (Figura 27A), mientras que en arterias coronarias de RZO, no modificó el efecto contráctil del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 27B). Sin embargo, la retirada mecánica del endotelio desenmascaró un marcado efecto inhibitor del NS 398 sobre el efecto vasoconstrictor del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en arterias coronarias de RZO, de similar magnitud en ambos grupos de animales (Figura 27 C, D). Estos resultados sugieren que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  estimula la producción de prostanoïdes contráctiles derivados de la COX-2 en el MLV, así como la producción de prostanoïdes relajantes derivados de la COX-2 en el endotelio de arterias coronarias en condiciones de SM, que compensarían la acción vasoconstrictora de los prostanoïdes contráctiles liberados por el MLV.

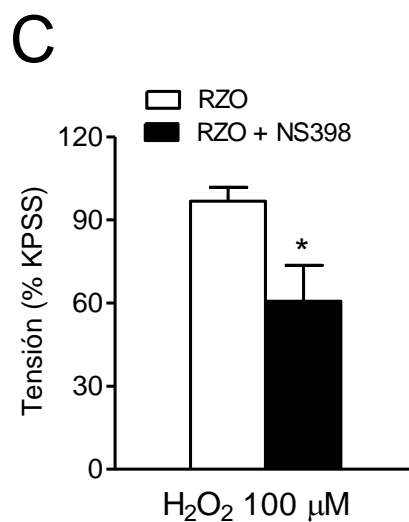
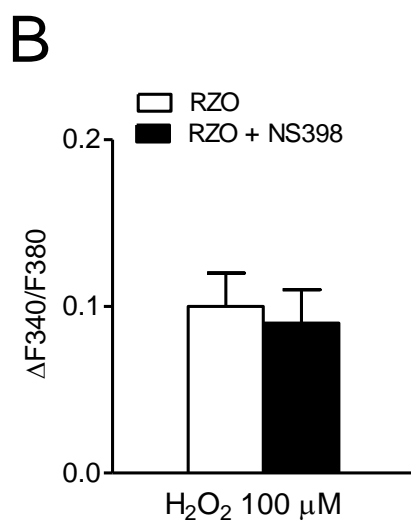
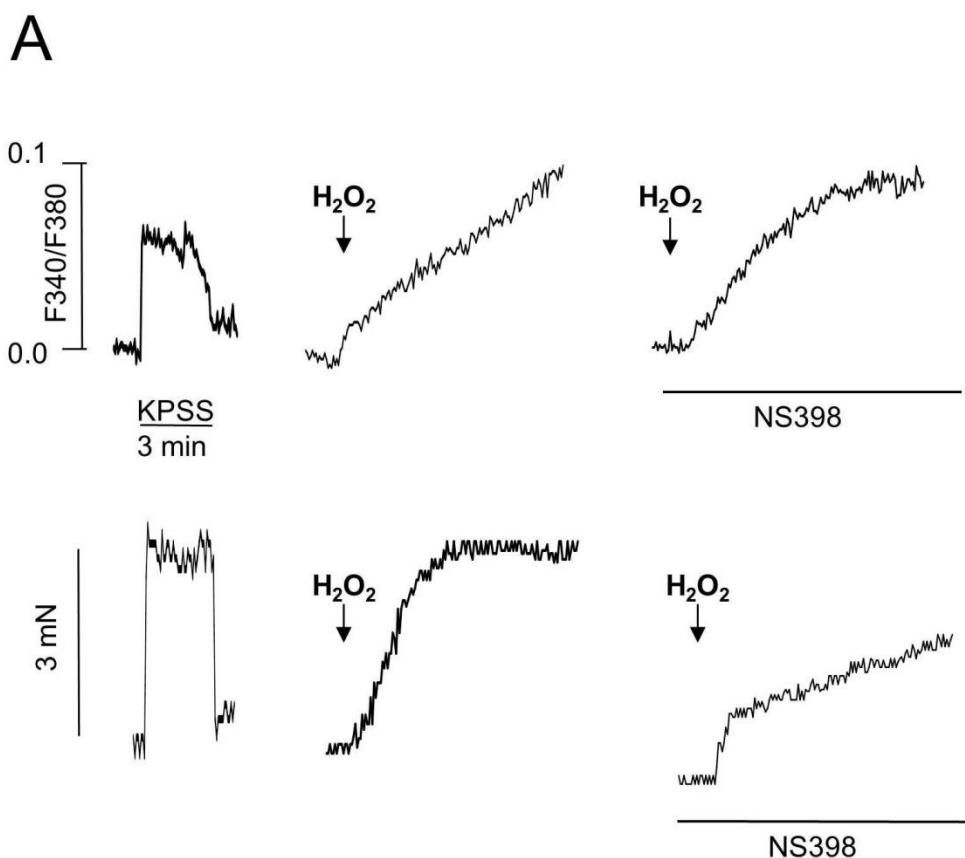
En arterias coronarias de RZO desprovistas de endotelio, el NS 398 no modificó el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\Delta F_{340}/F_{380} = 0.10 \pm 0.02$ ,  $n=2$  vs  $0.09 \pm 0.02$ ,  $n=3$  en ausencia y en presencia de NS398, respectivamente) (Figura 28A). Sin embargo, sí redujo de forma significativa el incremento en la tensión inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $98.4 \pm 4\%$  del KPSS,  $n=3$  vs  $61 \pm 12\%$  del KPSS,  $n=3$  en ausencia y en presencia de NS398, respectivamente,  $p<0,05$ ) (Figura 28B).

La inmunotinción de secciones arteriales transversales de arterias coronarias de RZL reveló que la COX-2 se expresa de forma discreta en el endotelio vascular, y en menor medida en el MLV (Figura 29A-D, izquierda). Además, tras la exposición aguda de las arterias coronarias al  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 45 minutos, esta tinción se reveló de forma mucho más marcada en la pared vascular y revela la inducción de dicha enzima fundamentalmente en el MLV, lo que sugiere que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de inducir la expresión de la COX-2 (Figura 29A-D, derecha). En arterias coronarias de RZO, la inmunotinción de secciones arteriales transversales reveló que la COX-2 se expresa tanto en el endotelio como en el MLV, siendo la expresión de la enzima mayor que en arterias de RZL (Figura 30A-D, izquierda), y estando marcadamente incrementada tras una exposición aguda al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig 31A-D, derecha).

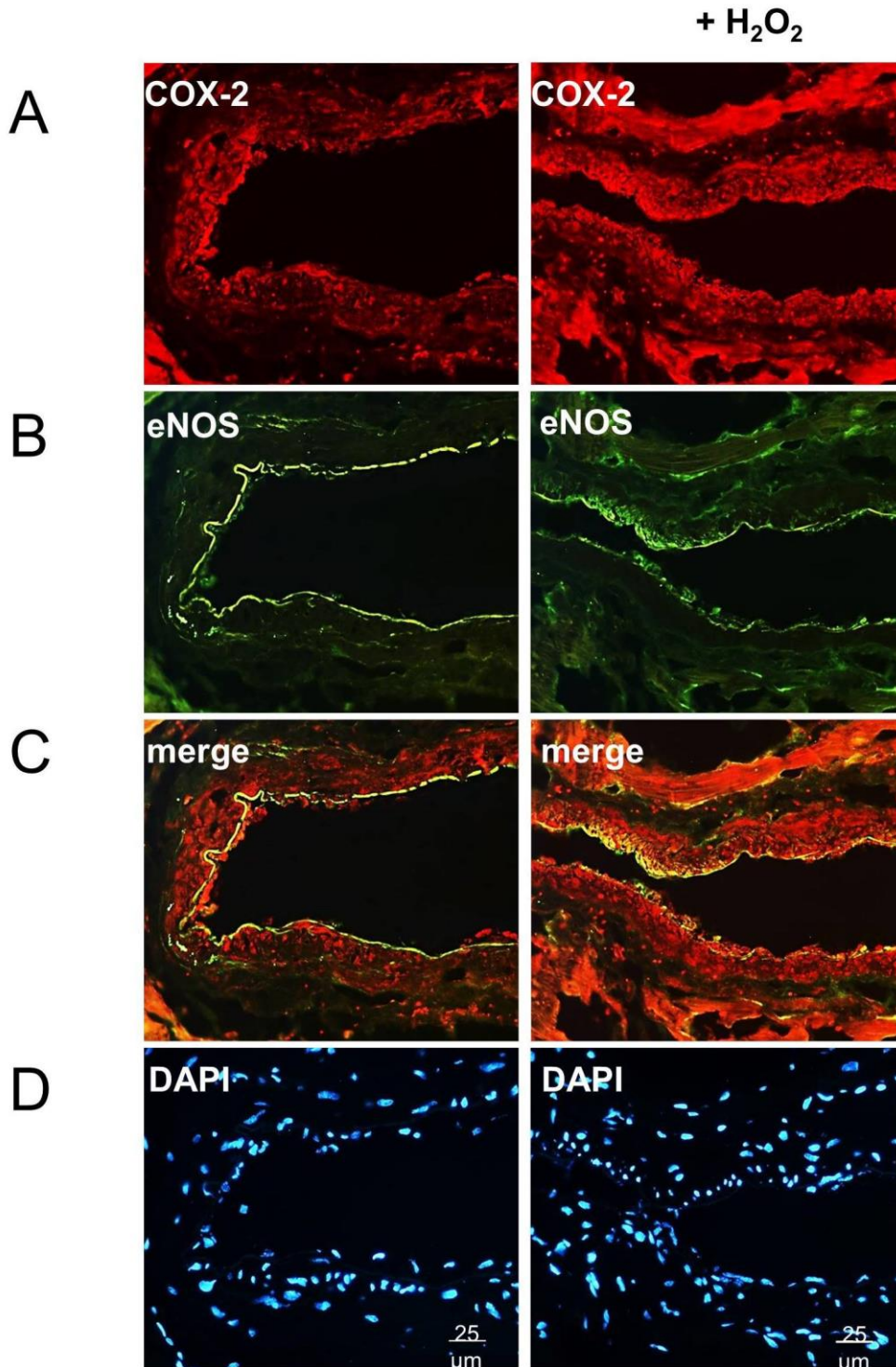
RESULTADOS



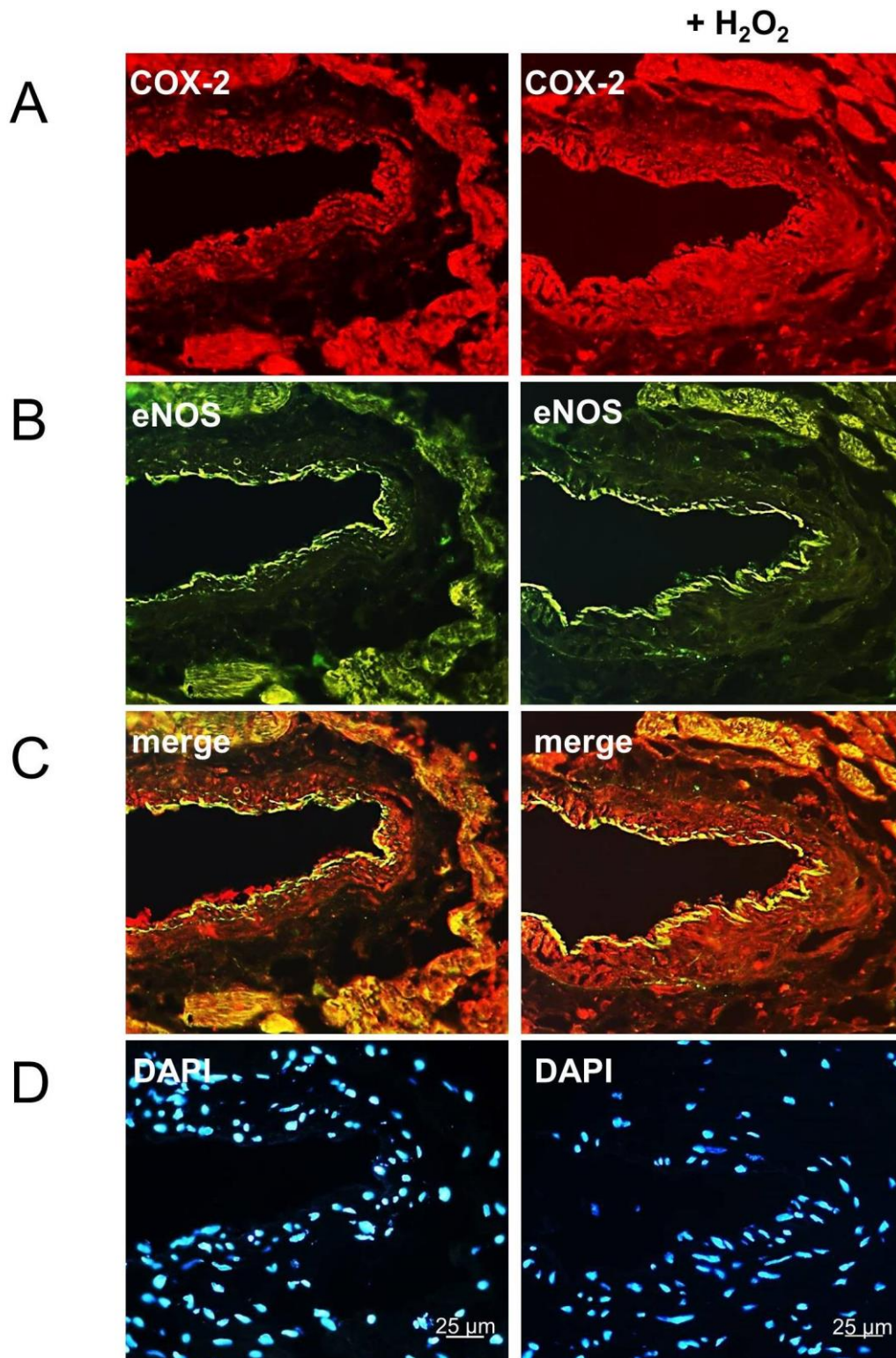
**Figura 27. La activación de la COX-2 en el MLV está implicada en la vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias de RZL y RZO.** (A, B) El inhibidor selectivo de la COX-2, NS 398 (1 μM), disminuyó significativamente la respuesta contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias de RZL (A), pero no en RZO (B) con endotelio intacto. (C, D) En arterias coronarias desprovistas de endotelio, el NS 398 (1 μM), redujo de forma significativa la respuesta contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto en RZL como en RZO. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 6-8 arterias. \*p < 0.05; \*\* p < 0.01.



**Figura 28. Efecto de la inhibición de la COX-2 sobre el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  y la tensión en respuesta al  $H_2O_2$  en arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZO.** (A) Registros simultáneos que muestran los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$  (A, arriba) y en la tensión (A, abajo) inducidos por  $H_2O_2$  en presencia y en ausencia de NS398 (1  $\mu M$ ) en arterias coronarias de RZO desprovistas de endotelio. (B, C) Media de los efectos del  $H_2O_2$  sobre los incrementos en la  $[Ca^{2+}]_i$  (B) y tensión (C). Los datos se expresan como valores absolutos de  $F_{340}/F_{380}$  (B) o como % de la contracción inducida por KPSS (C) y representan la media  $\pm$  ESM de 3 arterias. \* $p < 0.05$ .



**Figura 29. Localización inmunohistoquímica de la COX-2 en arterias coronarias de RZL y efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en su expresión.** (A) Tinción inmunohistoquímica que demuestra la expresión de la COX-2 en el endotelio de arterias coronarias de RZL, y la expresión de la COX-2 en el MLV coronario tras la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (áreas rojas). (B) El endotelio se visualizó mediante el marcador de anticuerpos anti-eNOS (verde), y (C) la doble inmunofluorescencia con el marcador de la eNOS y la COX-2 demuestra la colocalización en el endotelio (áreas amarillas) (D) Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (azul). Las secciones representan n=3 animales.

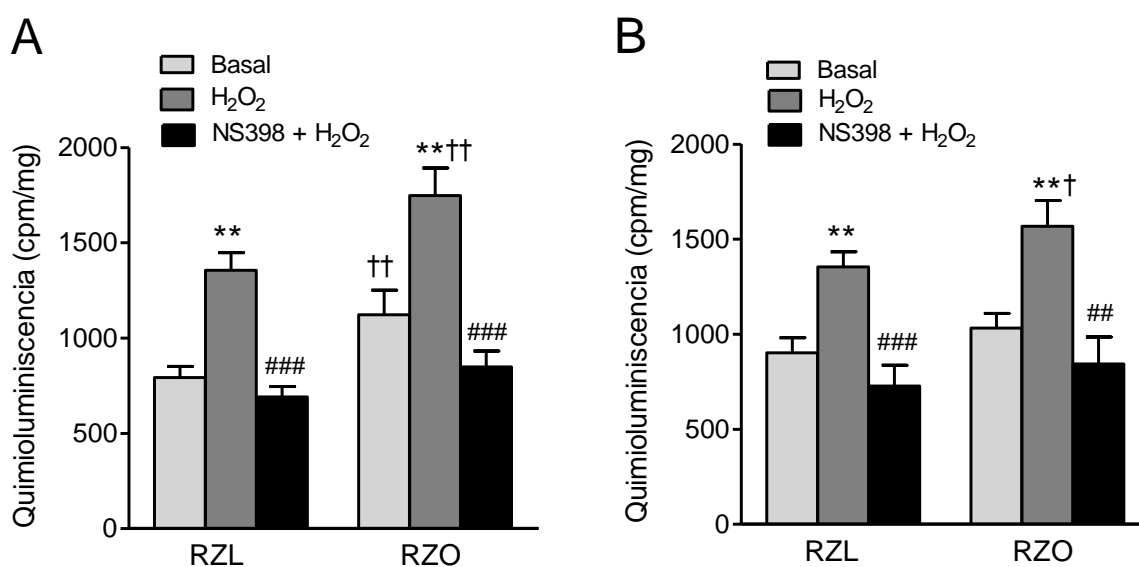


**Figura 30. Localización inmunohistoquímica de la COX-2 en arterias coronarias de RZO y efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en su expresión.** (A) Tinción inmunohistoquímica que demuestra la expresión de la COX-2 en el endotelio y MLV de arterias coronarias de RZO, y el incremento en la expresión de la COX-2 tras la incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (áreas rojas). (B) El endotelio se visualizó mediante el marcador de anticuerpos anti-eNOS (verde), y (C) la doble inmunofluorescencia con el marcador de la eNOS y la COX-2 demuestra la colocalización en el endotelio y en el MLV (áreas amarillas) (D) Marcaje de los núcleos celulares con DAPI (azul). Las secciones representan n=3 animales.

## RESULTADOS

### 4.4.2. La producción de superóxido estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es dependiente de la COX-2 y está incrementada en condiciones de Síndrome Metabólico

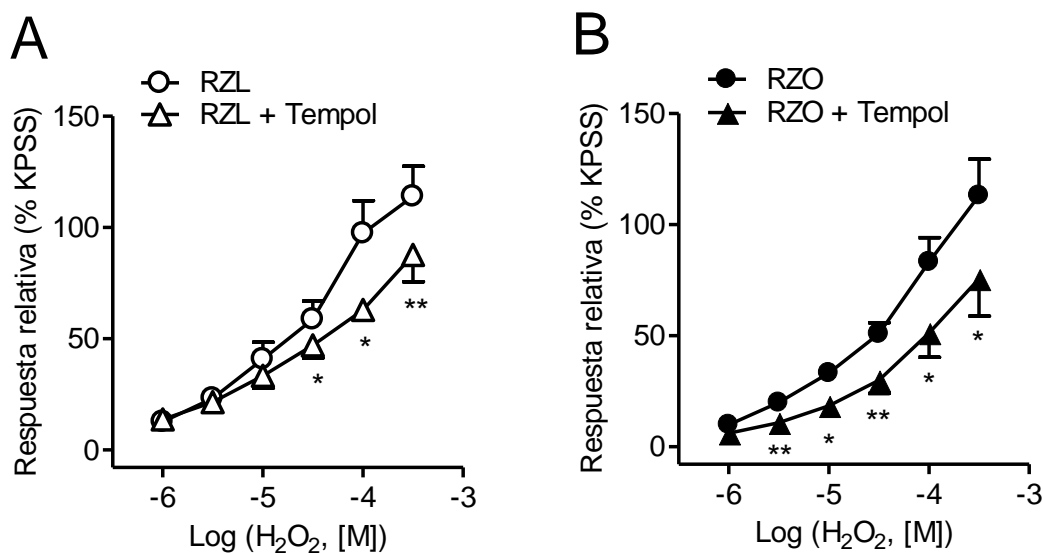
Los efectos de la inhibición de la COX-2 sobre la formación de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ , tanto basal como estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fueron cuantificados con quimioluminiscencia con lucigenina. La producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  tanto basal como en respuesta a la estimulación con peróxido fue mayor en RZO que en RZL, tanto en las arterias coronarias como en el miocardio (Figura 22, 31A, B), lo que sugiere la presencia de elevados niveles de estrés oxidativo en el corazón de animales con SM. Asimismo, el tratamiento con NS398 inhibió de forma significativa esta generación de  $\cdot\text{O}_2^-$  (Figura 32A, B). Estos resultados sugieren que la vasoconstricción inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediada a través de la formación de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ , cuya producción está incrementada en condiciones de SM y que se produce en parte por activación de la COX-2.



**Figura 31. La formación de radicales superóxido basal y estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está mediada por la COX-2 y está incrementada en condiciones de Síndrome Metabólico.** Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu\text{M}$ ) y del inhibidor de la COX-2 NS398 (1  $\mu\text{M}$ ) en la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  en RZO que en RZL, en arterias coronarias (A) y en el miocardio (B) de RZL y RZO. Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm) por mg de tejido y representan la media  $\pm$  ESM de 8-20 animales. \*\* $p < 0.01$  vs control antes de tratamiento; ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; † $p < 0.05$ , †† $p < 0.01$  vs LZR.

## RESULTADOS

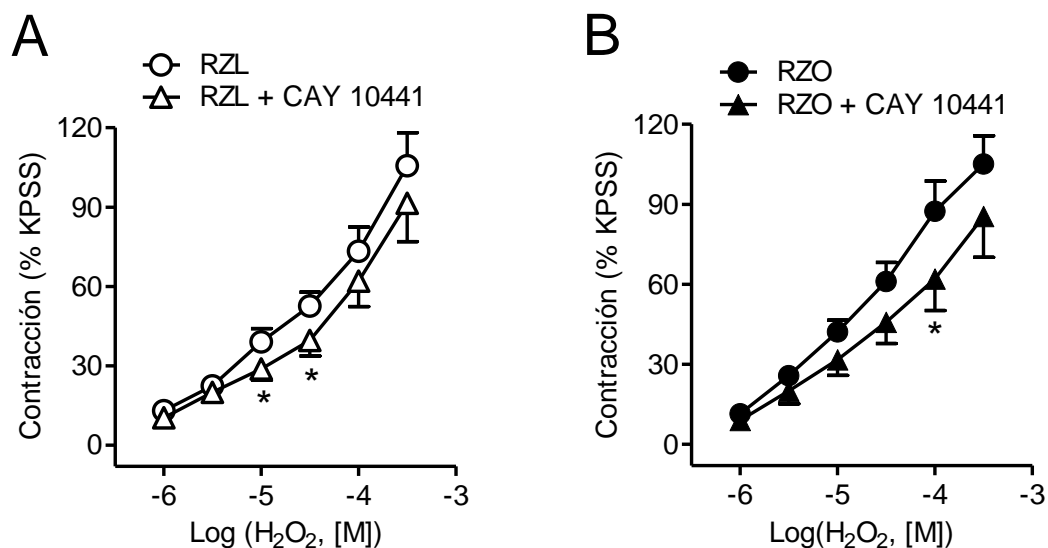
La incubación de las arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZL y RZO con tempol, *scavenger* de radicales libres, redujo la acción vasoconstrictora del  $H_2O_2$  de forma discreta pero significativa, lo que sugiere que los radicales  $\cdot O_2^-$ , que median la acción del  $H_2O_2$ , se generan en el MLV (Figura 33).



**Figura 32. El efecto contráctil del  $H_2O_2$  está mediado por la generación de aniones superóxido derivados del MLV.** (A, B) En arterias coronarias de RZL y RZO desprovistas de endotelio, el *scavenger* de radicales libres tempol (30  $\mu M$ ) redujo de forma significativa la respuesta contráctil del  $H_2O_2$ . Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media  $\pm$  ESM de 4-7 arterias. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

### 4.4.3. Papel de la prostaciclina en los efectos vasoactivos del $H_2O_2$

Tras la incubación de las arterias coronarias con el antagonista selectivo de los receptores IP de la  $PGI_2$ , CAY 10441 (0.1  $\mu M$ ), se observó una reducción discreta en la acción vasoconstrictora del  $H_2O_2$  en arterias de RZO y RZL, lo que sugiere que la prostaciclina puede actuar como un mediador contráctil tanto en arterias sanas como en arterias de animales con SM (Figura 33).



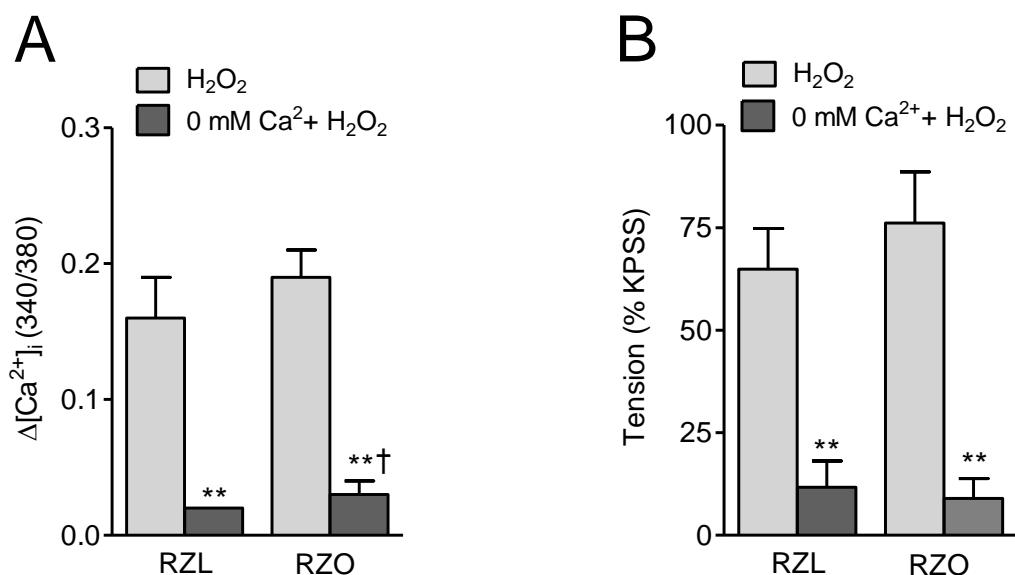
**Figura 33. La inhibición del receptor de PGI<sub>2</sub> reduce el efecto contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en RZL y RZO.** (A, B) Efecto del antagonista del receptor de PGI<sub>2</sub>, CAY 10441 (0.1 μM), sobre el efecto contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en arterias coronarias de RZL (A) y RZO (B) con el endotelio intacto. Los resultados se expresan como % de la contracción inducida por KPSS y representan la media ± ESM de 7-8 arterias. \*p < 0.05.

#### 4.5. Caracterización de la entrada de Ca<sup>2+</sup> SOC inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de Síndrome Metabólico

Con el fin de determinar si la respuesta contráctil al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias y el incremento previamente observado en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, debido tanto la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales tipo L como a través de canales SOC, se encuentran afectados en condiciones de SM, se procedió a realizar medidas simultáneas de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y de la tensión arterial en arterias coronarias intramiocárdicas de RZL y RZO.

En arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZL y RZO, la estimulación con una dosis única de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un incremento simultáneo y sostenido de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> acompañado de una vasoconstricción sostenida, ambas de similares proporciones en ambos grupos de animales (Figura 34). La respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tanto del Ca<sup>2+</sup> como de la tensión se vieron marcadamente reducidas tras la retirada del Ca<sup>2+</sup> extracelular (Figura 34), siendo la movilización del Ca<sup>2+</sup> intracelular mayor en arterias de RZO comparada con la de las arterias de RZL (Figura 34A).

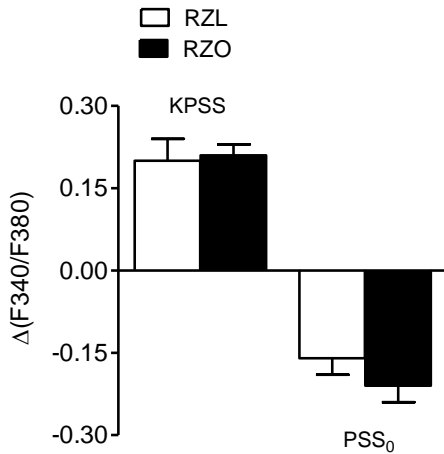
## RESULTADOS



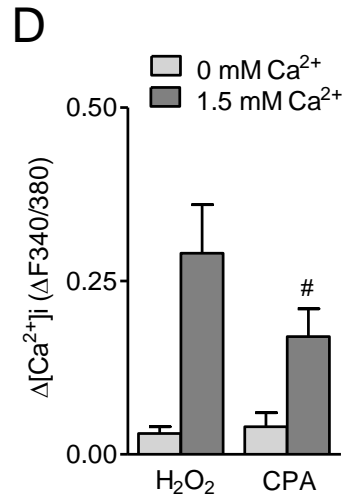
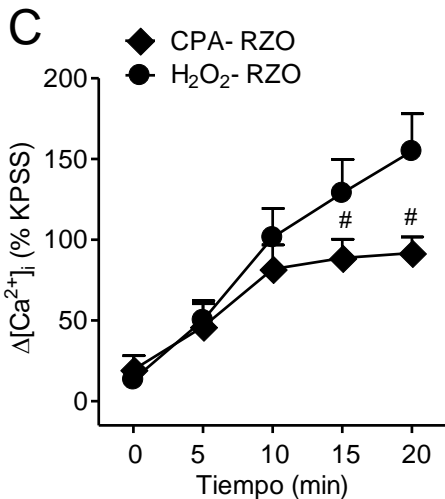
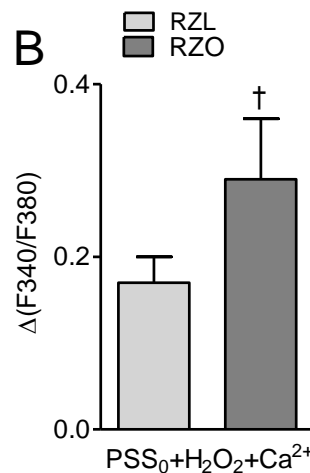
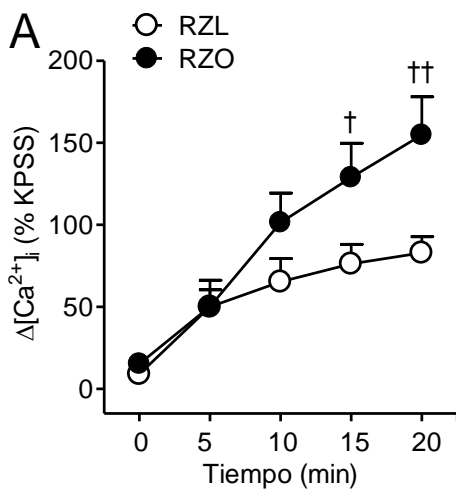
**Figura 34.** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce un incremento en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> asociado a contracción de similar magnitud en RZL y RZO pero la movilización intracelular de Ca<sup>2+</sup> es mayor en RZO. Cambios inducidos por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en reposo (A) y en la tensión basal (B) en presencia y en ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio extracelular en arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZL y RZO. Los resultados se expresan como valores absolutos de ratio (A) o como % de la contracción inducida por KPSS (B) y representan la media ± ESM de 3-4 arterias. \*\*p < 0.01 vs control; †p < 0.05 vs LZR.

En condiciones de SM, no se encontraron diferencias ni en el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por despolarización con KPSS ni en el tono basal arterial dependiente del Ca<sup>2+</sup> extracelular, demostrado por la disminución del ratio de Fura-2, en arterias desprovistas de endotelio de RZL y RZO, en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> en presencia de nifedipina (Figura 35). Sin embargo, la *entrada capacitativa* de Ca<sup>2+</sup> y su regulación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el MLV coronario si se encontraron alteradas en ratas con SM. Así, en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> en presencia de nifedipina, la entrada de Ca<sup>2+</sup> estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la readición de Ca<sup>2+</sup> durante 20 minutos, fue significativamente mayor en el MLV coronario de RZO que en RZL (Figura 36A, B). Curiosamente, la entrada SOC obtenida por la inhibición de la SERCA con CPA se encontró sustancialmente reducida en arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZO en comparación con la inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 36C, D) y a la obtenida en el MLV coronario sano obtenido en de ratas Wistar (Figura 17C, D). Todo ello sugiere una entrada de Ca<sup>2+</sup> SOC reducida en el MLV coronario en condiciones de SM.

RESULTADOS



**Figura 35. Caracterización de la entrada de Ca<sup>2+</sup> tipo L en arterias coronarias de RZL y RZO.** Cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en respuesta al KPSS y en un medio libre de Ca<sup>2+</sup>, en arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZL y RZO. Los resultados se expresan como valores absolutos de ratio y representan la media ± ESM de 4-10 arterias.



**Figura 36. El efecto agudo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la entrada de Ca<sup>2+</sup> SOC está incrementado pero la entrada de Ca<sup>2+</sup> SOC en el MLV está reducida en condiciones de Síndrome Metabólico.** (A) Datos resumidos que muestran los cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) en respuesta a la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio (1,5 mM) en RZL y RZO. (B) Cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> tras la readición de Ca<sup>2+</sup> al medio (1,5 mM) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) en arterias coronarias desprovistas de endotelio de RZL y RZO. (C, D) Efectos comparativos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) y CPA (20 μM) en el incremento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por la readición de Ca<sup>2+</sup> en arterias coronarias de RZO. Los resultados se expresan como valores absolutos de ratio (A, D) o como % de la contracción inducida por KPSS (B, C) y representan la media ± ESM de 4-10 arterias.; #p<0.05 vs tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; †p< 0.05, ††p< 0.01 vs LZR.

## **V. DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

Investigaciones durante la última década demuestran que las ROS juegan un papel esencial en la regulación fisiológica del flujo sanguíneo coronario. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  participa junto con el NO y la adenosina en la autorregulación coronaria (Yada et al., 2003) y es liberado por el endotelio vascular en respuesta al *shear stress* en el curso de la vasodilatación inducida por flujo de las arteriolas coronarias (Miura et al., 2003). Además, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  está involucrado en la vasodilatación metabólica inducida por el marcapasos cardíaco, de forma que el  $\cdot\text{O}_2^-$  producido como consecuencia del metabolismo cardíaco es capaz así de dilatar los vasos sanguíneos acoplado el flujo sanguíneo coronario al consumo de  $\text{O}_2$  del miocardio (Saito et al., 2006).

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral proporcionan nuevos datos sobre las vías de señalización implicadas en las acciones vasoactivas del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las arterias coronarias y establecen mecanismos de regulación REDOX de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L y de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por depósito en el MLV coronario. Se demuestran asimismo, los cambios en las respuestas vasoactivas y en los mecanismos de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en condiciones de estrés oxidativo y enfermedad vascular, como es el Síndrome Metabólico.

### 1. EFECTOS VASOACTIVOS DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN LAS ARTERIAS CORONARIAS

#### 1.1. Vasoconstricción coronaria inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desempeña un papel crítico en la respuesta EDH de las arterias coronarias, implicada tanto en la vasodilatación metabólica como en la mediada por flujo. Los resultados de este estudio demuestran que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa también como un vasoconstrictor dependiente del endotelio en las arterias coronarias. Así, el efecto contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está correlacionado con el diámetro arterial, se encuentra incrementado en arterias despolarizadas y está acoplado a diversos mecanismos de señalización intracelular que incluyen la liberación de un agonista del receptor TP derivado de la COX, la generación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> derivado de la NADPH oxidasa y la estimulación de las vías de las MAPK y de la Rho quinasa.

A nivel vascular, los efectos vasoactivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> han sido ampliamente estudiados, habiéndose descrito efectos tanto relajantes como contráctiles, dependiendo del lecho vascular estudiado, las condiciones experimentales y la especie animal utilizada (Gao et al., 2004; Ardanaz y Pagano, 2006; García-Redondo et al., 2009). En este estudio, se ha observado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce un efecto predominantemente contráctil en los segmentos proximales de la arteria coronaria anterior descendente izquierda, mientras que en los segmentos más distales y en las arterias mesentéricas de 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> orden, bajo las mismas condiciones experimentales, induce un efecto relajante. La correlación entre el diámetro interno de la arteria y las respuestas contráctiles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obtenidas en la tensión basal han confirmado la dependencia del tamaño del vaso de la respuesta contráctil al peróxido en las arterias coronarias. Esta vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es menor en las arterias más pequeñas, lo que sugiere que existe un mayor componente relajante en la respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las arterias de menor tamaño. Estos resultados son consistentes con trabajos previos que demuestran que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como vasodilatador endógeno principalmente en arteriolas y microvasos coronarios (Matoba et al., 2003; Miura et al., 2003; Yada et al., 2003; Yada et al., 2007) y con datos recientes en el lecho arterial mesentérico que muestran que la sensibilidad a los efectos vasodilatadores del peróxido se correlaciona también con el tamaño del vaso, exhibiendo las arterias mesentéricas más pequeñas la mayor sensibilidad (Prysyazhna et al., 2012).

En nuestro estudio se demuestra la especificidad del efecto contráctil observado para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que la enzima catalasa fue capaz de inhibir dicho efecto de forma significativa.

## DISCUSIÓN

Estos resultados están en concordancia con estudios previos que han descrito la inhibición de la contracción inducida por  $H_2O_2$  en la arteria aórtica en presencia de catalasa (Rodríguez-Martínez et al., 1998), y también con estudios donde se demuestra el efecto inhibitor de la catalasa sobre los efectos vasoactivos del  $H_2O_2$  endógeno y en los que se ha descrito una reducción sostenida de la presión sanguínea en arteriolas de ratón *in vivo* cuando se induce la sobreexpresión de catalasa humana, reducción que se ve inhibida tras el tratamiento de los vasos con aminotriazol, inhibidor específico de esta enzima (Suvorava et al., 2005).

Se ha descrito que el  $H_2O_2$  actúa como factor implicado en la respuesta EDH en arterias coronarias (Matoba et al., 2003; Miura et al., 2003; Yada et al., 2003) y que es capaz de activar diversos tipos de canales de  $K^+$  en el MLV coronario incluidos los canales  $BK_{Ca}$  y los canales  $K_v$  (Barlow y White, 1998; Barlow et al., 2000; Rogers et al., 2007; Liu et al., 2011). De acuerdo con esto, la despolarización parcial con  $K^+_{30}$  y la consiguiente abolición de la corriente de salida de  $K^+$ , produce una inhibición del efecto relajante inducido por el  $H_2O_2$  en arterias coronarias distales y en arterias mesentéricas de 2<sup>o</sup>-3<sup>er</sup> orden, desenmascarándose un efecto contráctil moderado en dichas arterias. En estas mismas condiciones experimentales, en segmentos proximales de la arteria coronaria descendente izquierda, se produce una mayor vasoconstricción sostenida. Estos datos sugieren que, además del tamaño del vaso, la despolarización de la membrana plasmática y la actividad funcional de los canales de  $K^+$  son factores clave que determinan la variabilidad en la respuesta vascular al  $H_2O_2$  (Lucchesi et al., 2005; Ardanaz et al., 2007; Thakali et al., 2007). De hecho, en el trabajo realizado por Barlow y White (1998), se demuestra que el  $H_2O_2$  activa canales  $BK_{Ca}$  en arterias coronarias a través de la vía de la LOX, y que al inhibir esa vía se desenmascara un potente efecto vasoconstrictor del  $H_2O_2$ .

Se han descrito papeles contrapuestos en lo referente a la implicación del endotelio en la respuestas vasoactivas al  $H_2O_2$  pudiendo ser la acción relajante producida por el  $H_2O_2$  tanto dependiente como independiente del endotelio vascular (Ardanaz y Pagano, 2006; Wolin, 2009). De forma similar, la implicación del endotelio en la respuesta contráctil inducida por el  $H_2O_2$  es variable. Así, mientras que la vasoconstricción producida por el  $H_2O_2$  no se ve afectada (Lucchesi et al., 2005; Puri et al., 2013) o se ve incrementada (Gao y Lee, 2005) en arterias mesentéricas y renales desprovistas de endotelio, respectivamente, en arterias cerebrales (Yang et al., 1999) y pulmonares (Pourmahram et al., 2008), la retirada mecánica del endotelio inhibe parcialmente la vasoconstricción producida por el  $H_2O_2$ . De acuerdo con estos últimos resultados, en el presente trabajo la vasoconstricción sensible a catalasa inducida por el  $H_2O_2$

## DISCUSIÓN

en arterias coronarias intramiocárdicas se vió marcadamente reducida tras la retirada del endotelio, lo que sugiere que una parte importante de la respuesta contráctil al  $H_2O_2$  se debe a la liberación de un mediador endotelial. Asimismo, la vasoconstricción producida por el  $H_2O_2$  se redujo de forma similar tras la inhibición de la COX y del TP con indometacina e ICI 192, respectivamente, lo que indica que el  $H_2O_2$  induce la liberación de un vasoconstrictor endotelial de naturaleza prostanoide que actúa sobre el receptor TP en las arterias coronarias.

La activación de la COX y la liberación de un agente constrictor agonista del receptor TP parece ser una vía intracelular común implicada en la vasoconstricción inducida por  $H_2O_2$  tanto en arterias como en venas (Barlow y White, 1998; Ardanaz y Pagano, 2006; Thakali et al., 2007; Pourmahram et al., 2008; Puri et al., 2013), posiblemente debido a que la reacción catalizada por la COX para convertir ácido araquidónico en prostaglandina  $H_2$  es dependiente de peróxido y activada por hidroperóxidos, peroxinitrito y  $H_2O_2$  (Kulmacz, 2005). Además, publicaciones recientes han demostrado que el  $H_2O_2$  también es capaz de inducir incrementos sostenidos en la expresión funcional del receptor TP en la membrana celular, mediando por tanto una hiperreactividad persistente a los agonistas de dicho receptor. La implicación de las respuestas mediadas por el receptor TP en la vasoconstricción coronaria inducida por  $H_2O_2$ , como se demuestra en este trabajo, tiene una importancia fisiopatológica ya que se ha descrito que la producción de  $H_2O_2$  inducida por el  $TXA_2$  y la consiguiente vasoconstricción están incrementadas de forma notable en modelos experimentales de hipertensión (Rodríguez-Martínez et al., 1998; Gao y Lee, 2001; García-Redondo et al., 2009) y diabetes (Erdei et al., 2007).

### **1.2. Efecto contráctil del $H_2O_2$ dependiente del estado redox**

Estudios recientes han demostrado que la capacidad del  $H_2O_2$  de producir vasoconstricción o vasodilatación en arterias de resistencia está condicionada por el estado redox de la pared arterial (Puri et al., 2013). El  $H_2O_2$  es un agente oxidante, y puede participar en la señalización redox e influenciar varios sistemas de regulación vascular, incluyendo la actividad funcional de canales de  $K^+$ , la expresión del receptor TP, la estimulación de vías intracelulares dependientes de quinasas, y la regulación de proteínas dependientes de  $Ca^{2+}$  implicadas en el mantenimiento del tono arterial (Tang et al., 2004; Ardanaz y Pagano, 2006; Rogers et al., 2007; Wolin, 2009; Ball et al., 2010). El  $H_2O_2$  parece ser capaz de producir una

## DISCUSIÓN

activación sensible al estado redox de canales  $K_v$  en miocitos coronarios (Rogers et al., 2007) y el  $H_2O_2$  derivado del metabolismo cardiaco induce una vasodilatación a través de mecanismos redox que implican la oxidación de grupos tiol (Saitoh et al., 2007). En el presente estudio se ha demostrado una relación directa entre el efecto vasoconstrictor del  $H_2O_2$  y el estado oxidante de la pared arterial en arterias coronarias intramiocárdicas, ya que el estímulo con concentraciones submaximales de  $H_2O_2$  inducen un aumento marcado de la producción basal de  $\cdot O_2^-$ , y en presencia del mimético de la SOD tempol, se reduce la producción de  $\cdot O_2^-$  y disminuye significativamente la contracción producida por el  $H_2O_2$ . Además, el tejido miocárdico adyacente respondió a la estimulación con  $H_2O_2$  con un pronunciado incremento en los niveles basales de  $\cdot O_2^-$ , de forma similar a las arterias coronarias. Esta vía común en la respuesta al  $H_2O_2$  es consistente con el concepto del  $H_2O_2$  como un metabolito vasoactivo que acopla el metabolismo cardiaco con el flujo sanguíneo coronario (Saitoh et al., 2006; Saitoh et al., 2007).

El sistema de la NADPH oxidasa es una de las principales fuentes de producción de  $\cdot O_2^-$  en arterias coronarias humanas (Guzik et al., 2006) y el  $H_2O_2$  derivado de la dismutación del  $\cdot O_2^-$  es capaz de inducir una mayor producción de  $\cdot O_2^-$  por estimulación de la NADPH oxidasa (Li et al., 2001; Paravicini y Touyz, 2008; Wolin, 2009). De acuerdo con esto, en este estudio, la inhibición de la NADPH oxidasa con apocinina redujo la vasoconstricción producida por el  $H_2O_2$  en arterias coronarias de la rata, lo cual es consistente con estudios recientes que demuestran que el  $H_2O_2$  activa la producción de  $\cdot O_2^-$  en fibroblastos aórticos y arterias coronarias humanas (Li et al., 2001), y que el tratamiento con apocinina inhibe la respuesta contráctil en respuesta al  $H_2O_2$  en arterias mesentéricas (García-Redondo et al., 2009).

### **1.3. Papel de las MAPK y de la Rho quinasa en el efecto contráctil del $H_2O_2$**

Las ERK y p38 MAPK han sido implicadas de manera diferente en el efecto vasoconstrictor del  $H_2O_2$ , a través de mecanismos de sensibilización al  $Ca^{2+}$  mediante la fosforilación de proteínas contráctiles (Lucchesi et al., 2005; Ardanaz y Pagano, 2006; Thakali et al., 2007). Estas vías pueden ser activadas por procesos redox, provocados por la oxidación de residuos de cisteína (Jin et al., 2004; Oeckler et al., 2005). Además, la activación de la ERK y de la p38 MAPK por el  $H_2O_2$  puede estimular la producción de  $\cdot O_2^-$  a través de la NADPH vascular, contribuyendo por tanto al mantenimiento del tono vascular (Ding et al., 2007). En

## DISCUSIÓN

este estudio, la inhibición selectiva de la ERK MAPK con PD 98059 redujo la contracción inducida por  $H_2O_2$  en arterias coronarias intramiocárdicas despolarizadas, sin inhibir la contracción inducida por el  $K^+30$ . Estos hallazgos son consistentes con los descritos en preparaciones de aorta y vena cava despolarizadas (Ardanaz et al., 2007; Thakali et al., 2007) y apoyan de manera más específica estudios previos en arterias coronarias bovinas en las que se observa que el  $H_2O_2$  estimula a la ERK MAPK a través de la vía de señalización Scr-EGFR produciendo un efecto contráctil. Este mecanismo está mediado por el  $H_2O_2$  derivado de la activación de la NADPH oxidasa, y está implicado en la generación de fuerza contráctil inducida por el estiramiento en el músculo liso coronario en condiciones fisiológicas (Oeckler et al., 2003).

El  $H_2O_2$  activa la p38 MAPK en células de MLV (Oeckler et al., 2003) y su activación está implicada en la contracción inducida por el  $H_2O_2$  en arteria aorta despolarizada, arteria mesentérica superior y vena cava (Ardanaz et al., 2007; Thakali et al., 2007), y también en la transducción mecánica de la tensión de la pared en las arteriolas del músculo esquelético (Masset et al., 2002). En las arteriolas coronarias, la inhibición de la p38 MAPK redujo el tono miogénico y atenuó la vasodilatación sensible al estado redox tanto del  $H_2O_2$  exógeno como del buffer condicionado de los miocitos cardiacos funcionales, lo que sugiere que la activación de la p38 MAPK está implicada en el metabolismo cardiaco sensible al estado redox mediado por el  $H_2O_2$  (Saitoh et al., 2007). En este estudio, el inhibidor selectivo de la p38 MAPK SB 239063 redujo la vasoconstricción inducida por las concentraciones más bajas de  $H_2O_2$  en arterias coronarias despolarizadas sin afectar a la inducida por la despolarización del  $K^+30$ , lo que sugiere que la p38 MAPK está también implicada en las acciones contráctiles del  $H_2O_2$  en arterias coronarias. Las discrepancias de estos resultados con otros estudios que demuestran la implicación de la p38 MAPK en el efecto vasodilatador coronario del  $H_2O_2$  pueden ser atribuidos a diferencias en el tamaño de los vasos y al estado redox de la pared arterial.

En consonancia con los presentes resultados que muestran que la activación de la p38 MAPK media el efecto contráctil del  $H_2O_2$ , la inhibición de la p38 MAPK redujo el efecto contráctil provocado por el  $H_2O_2$  en arteria aorta despolarizada, en la vena cava y en la arteria mesentérica, tanto superior como en ramas más pequeñas (Lucchesi et al., 2005; Ardanaz et al., 2007; Thakali et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que el  $H_2O_2$  producido por fibroblastos perivasculares bajo el estímulo de la Ang II provoca vasoconstricción y afecta a la relajación dependiente del endotelio a través de la activación de la p38 MAPK (Cascino et al., 2011). Además, la inhibición del efecto contráctil del  $H_2O_2$  en arterias coronarias por

## DISCUSIÓN

antagonistas tanto de la p38 MAPK como del receptor TP sería consistente con la implicación de la activación de la p38 MAPK en la vasoconstricción inducida por el TXA<sub>2</sub> en arterias de resistencia (Bolla et al., 2002).

La activación de la Rho quinasa a través de la translocación de la proteína Rho a la membrana plasmática está implicada en el mecanismo de vasoconstricción inducido por ROS en el MLV (Jin et al., 2004) y se ha demostrado que la inhibición selectiva de la Rho quinasa bloquea la contracción inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en preparaciones tanto arteriales como venosas despolarizadas (Ardanaz et al., 2007; Thakali et al., 2007), pero no afecta al componente de contracción sostenida del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias pulmonares de rata (Pourmahram et al., 2008). En el presente estudio, la inhibición de la Rho quinasa produjo una marcada reducción de la vasoconstricción en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias despolarizadas sugiriendo la implicación de la Rho quinasa. A diferencia del bloqueo de la NADPH oxidasa, de la COX/receptor TP y de las vías de las MAPK, que no afectaron a la precontracción con K<sup>+</sup>30, descartando así una activación de tales vías por el precondicionamiento con K<sup>+</sup>, la inhibición selectiva de la Rho quinasa redujo la contracción inducida por el K<sup>+</sup>30 en arterias coronarias, como ya se ha observado en otros lechos vasculares (Ardanaz et al., 2007; Thakali et al., 2007). Esto puede ser atribuido al hecho de que la sensibilización al Ca<sup>2+</sup> que conlleva la activación de la Rho quinasa puede ser provocada no sólo por mecanismos independientes de Ca<sup>2+</sup> mediados por agonistas sino también por la despolarización de la membrana y la activación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> en el MLV (Sakurada et al., 2003; Contreras et al., 2011). Por tanto, la activación de la Rho quinasa por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede estar influenciada por la señalización del Ca<sup>2+</sup> subyacente a la vasoconstricción que produce el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias.

## 2. PAPEL DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN LOS EFECTOS VASOACTIVOS DEL $\text{H}_2\text{O}_2$ EN ARTERIAS CORONARIAS

Los efectos contráctiles del  $\text{H}_2\text{O}_2$  han sido asociados tanto a mecanismos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  como a mecanismos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  (Touyz, 2005; Ardanaz y Pagano, 2006). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otras ROS pueden activar la movilización intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la inhibición de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la activación de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  para incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  total. A la inversa, la actividad de las enzimas generadoras de ROS como la NADPH oxidasa o la NOS se puede regular a través de diversos estímulos que inducen cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Touyz, 2005; Ardanaz y Pagano, 2006).

### 2.1. Acciones del $\text{H}_2\text{O}_2$ en la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ a través de canales VOC en las arterias coronarias

En este estudio, la vasoconstricción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  estuvo estrechamente asociada a incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en arterias intramiocárdicas despolarizadas. El marcado efecto inhibitorio tanto sobre el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como sobre la tensión producido por el bloqueante selectivo de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes de tipo L, nifedipina, indica que esta movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en parte es debida a la afluencia incrementada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales voltaje dependientes de tipo L. Los resultados aquí descritos están en concordancia con trabajos anteriores en arterias sistémicas de resistencia (Tabet et al., 2004; García-Redondo et al., 2009) y arterias cerebrales (Yang et al., 1999), y también con estudios recientes que demuestran que la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  derivado de la NADPH oxidasa estimula las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L en miocitos arteriales, vinculando funcionalmente la señalización oxidante local con la actividad sostenida del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L y con la vasoconstricción (Chaplin y Amberg, 2012). Además, la activación por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L en arterias coronarias es un mecanismo compartido por miocitos cardiacos, en los que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  endógeno es un activador de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Hool y Arthur, 2002).

En e presente estudio, tanto el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  como la vasoconstricción inducidos por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se redujeron en arterias coronarias desprovistas de endotelio. Se ha demostrado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares en células

## DISCUSIÓN

endoteliales, lo que produce un efecto relajante similar al inducido por el EDHF en arterias de pequeño tamaño (Edwards et al., 2008). Debido a esto, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  podría inducir la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos de células endoteliales coronarias acopladas a la liberación de un vasoconstrictor derivado de la COX, probablemente  $\text{TXA}_2$ . De hecho, la vasoconstricción inducida por el análogo del  $\text{TXA}_2$  se vio acompañada del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tanto de tipo L como de tipo no L en músculo liso coronario. Por otro lado, mientras la contracción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue en parte dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de tipo L, cerca de un tercio del incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en arterias coronarias con el endotelio intacto y la mayor parte del incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en arterias desprovistas de endotelio fue resistente a nifedipina. Esto es consistente con el hecho de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares y de activar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales no selectivos de cationes en músculo liso coronario, como ya se ha descrito previamente en miocitos arteriales pulmonares (Lin et al., 2007; Pourmahram et al., 2008). La despolarización inducida por la corriente interna activada por el peróxido a través de estos canales en miocitos vasculares (Lin et al., 2007) puede contribuir a la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes tipo L, con la consiguiente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y a la vasoconstricción, como se ha descrito en este estudio.

La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que subyace la vasoconstricción coronaria puede tener un efecto directo sobre el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o ser consecuencia de su capacidad para generar  $\cdot\text{O}_2^-$ . Se ha descrito que la vasoconstricción sostenida producida por el  $\cdot\text{O}_2^-$  es resistente al bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L con nifedipina en arterias coronarias (Ishihara et al., 2008); por ello es probable que el  $\cdot\text{O}_2^-$  participe en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales no tipo L en arterias coronarias. En la segunda parte del presente estudio de Tesis Docotoral, se pretende aclarar el papel del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  y en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no sensible a nifedipina en el músculo liso coronario.

### **2.2. Acciones del $\text{H}_2\text{O}_2$ en la entrada de $\text{Ca}^{2+}$ operada por depósito en las arterias coronarias**

Las interacciones entre las ROS y la maquinaria molecular implicada en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no tipo L en el MLV están relativamente poco exploradas. El presente estudio proporciona evidencia experimental de una regulación redox en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  SOC en el MLV

## DISCUSIÓN

coronario, así como cambios asociados con el estrés oxidativo en este influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por la depleción de los depósitos intracelulares en condiciones de disfunción vascular en el SM.

La regulación redox de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  independientes de voltaje ha sido descrita previamente, principalmente en células no excitables incluyendo células sanguíneas y células endoteliales, donde la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  SOC es una vía principal de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hu et al., 1998; Az-ma et al., 1999; Balzer et al., 1999; Hu et al., 2000; Redondo et al., 2004a; Redondo et al., 2004b; Florea y Blatter, 2008; Cioffi, 2011). En las células del endotelio vascular, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otras ROS son capaces de inducir aumentos en  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a través de la interacción con canales de la membrana plasmática, con los IP3R y/o con la SERCA (Hu et al., 1998; Az-ma et al., 1999; Balzer et al., 1999; Hu et al., 2000; Poteser et al., 2006; Florea y Blatter, 2008; Cioffi, 2011; Sun et al., 2011). Los resultados del presente estudio sugieren, indirectamente, que el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el MLV de las arterias coronarias es parcialmente dependiente de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del endotelio, estando probablemente asociado a la liberación de  $\text{TXA}_2$ . Así, el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  del MLV se redujo después de la retirada del endotelio vascular, lo que indica que el endotelio libera un factor contráctil que moviliza  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo subyacente. Teniendo en cuenta que parte de la vasoconstricción del peróxido se debe a la liberación de un agonista del receptor TP, y que el agonista exógeno del receptor TP, U46619, produce vasoconstricción acoplada a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en el MLV coronario, se puede sugerir que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúa en el endotelio vascular promoviendo la liberación de  $\text{TXA}_2$ . Se ha demostrado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede potenciar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares de las células endoteliales probablemente por una modificación redox del IP3R, lo que conduce a un incremento de la respuesta EDH de las arterias iliacas (Edwards et al., 2008). En las arterias coronarias existe una liberación basal de  $\text{TXA}_2$  del endotelio (Sánchez et al., 2010), y nuestro grupo ha demostrado recientemente que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por agonista en las células endoteliales está acoplada a la liberación de mediadores endoteliales (Climent et al., 2014).

Por otro lado, las acciones de las ROS sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC en el MLV han sido relativamente poco estudiadas (Trebak et al., 2011; Nunes y Demaurex, 2014). Los resultados de este estudio demuestran que en las arterias coronarias intactas el  $\text{H}_2\text{O}_2$  moviliza  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares del MLV activando una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  significativa, resistente a nifedipina e independiente de voltaje en el MLV coronario. Esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  es de magnitud similar a la obtenida por la máxima despolarización con  $\text{K}^+$  (KPSS) y subsiguiente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de tipo L, y de una magnitud de más

## DISCUSIÓN

de la mitad de la entrada SOC obtenida por la inhibición de la SERCA y depleción pasiva de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS con CPA.

A pesar de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  produce vasoconstricción mediante la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L sensibles a nifedipina en las arterias coronarias, los resultados obtenidos también revelan un desacoplamiento entre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  independiente del voltaje y la contracción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el MLV coronario, consistente con el desacoplamiento entre la *entrada capacitiva* de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por la inhibición de la SERCA con CPA y la vasoconstricción en las mismas arterias. Esta disociación entre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la contracción está en consonancia con observaciones previas en otras arterias pequeñas y arteriolas y sugiere que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales SOC se limita a un compartimento subcelular que tiene acceso limitado al aparato contráctil (Flemming et al., 2002; Snetkov et al., 2003; Villalba et al., 2007). De acuerdo con estos resultados, se ha descrito que la entrada SOC, las corrientes CRAC y los canales proteicos implicados en la SOC están regulados al alza en células de MLV sintéticas en comparación con los miocitos vasculares quiescentes, y están asociados a la expresión génica, la proliferación y la migración (Potier et al., 2009a; Hopson et al., 2011). Los presentes hallazgos sugieren que la *entrada capacitiva* de  $\text{Ca}^{2+}$  no acoplada a la contracción activada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las arterias coronarias podría estar involucrada en los procesos de remodelado de la pared arterial en condiciones de estrés oxidativo.

Los estudios sobre el papel de las ROS en la entrada SOC en células no excitables ofrecen resultados controvertidos, habiéndose descrito que las ROS pueden producir tanto un incremento como una atenuación de la *entrada capacitativa* de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos efectos opuestos se han atribuido a la concentración, al tiempo de exposición y al tipo de especies oxidantes utilizadas en los protocolos experimentales agudos. En plaquetas humanas (Redondo et al., 2004), células endoteliales (Elliott et al., 1989; Hu et al., 1998; Florea y Blatter, 2008) y miocitos arteriales pulmonares (Lin et al., 2007), las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el rango de micromolar (hasta  $500 \mu\text{M}$ ), estimulan la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares de forma dependiente de la dosis y evocan una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que las concentraciones milimolares más altas tienen un efecto inhibitor sobre la entrada SOC que es dependiente del tiempo y es obtenida también tras la exposición prolongada a dosis activadoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Florea y Blatter, 2008). De acuerdo con estas observaciones, los presentes resultados indican que la regulación redox de la entrada SOC en el MLV coronario también depende de los niveles locales de ROS: mientras que tras la

## DISCUSIÓN

exposición a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 minutos se obtiene una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima resistente a nifedipina, a concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  más altas esta respuesta del  $\text{Ca}^{2+}$  y también la entrada SOC provocada por la inhibición de la SERCA con CPA se reducen en las arterias coronarias, lo que sugiere una inhibición de esta entrada dependiente de los depósitos bajo condiciones de estrés oxidativo vascular. Los efectos inhibitorios de los altos niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se explican actualmente por la oxidación irreversible de los grupos tiol de las proteínas en condiciones oxidantes elevadas, consideradas como daño oxidativo (Nunes y Demaurex, 2014). De acuerdo con esto y con los presentes hallazgos en el MLV coronario, se ha demostrado que las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de hasta 100  $\mu\text{M}$  activan la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y las respuestas relajantes de tipo EDH en arterias coronarias porcinas, mientras que las concentraciones milimolares inhiben la bomba y alteran la contracción del MLV (Wong et al., 2014).

La identidad molecular de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  no dependientes de voltaje que median las corrientes CRAC y la entrada SOC han sido establecidos en la última década. Se ha identificado a la proteína STIM1 como el sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE capaz de oligomerizarse y reorganizarse en estructuras puntiformes en las uniones de la membrana plasmática y el RE como señal de activación del canal de SOC tras el agotamiento de los depósitos (Roos et al., 2005). Asimismo, la proteína de la membrana plasmática selectiva al  $\text{Ca}^{2+}$  Orai1 ha demostrado ser una subunidad formadora de poros esencial del canal SOC, también conocido como canal CRAC (Vig et al., 2006). La interacción entre STIM1 y Orai1 conduce a la apertura del canal y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, STIM1 puede interactuar con proteínas de los canales de la subfamilia TRPC incluyendo TRPC1, que también pueden formar complejos con Orai1 contribuyendo así a la entrada SOC (Ong et al., 2007; Jardin et al., 2008). Las ROS pueden influir sobre la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  SOC ya sea a través de efectos directos sobre la maquinaria molecular del canal SOC incluyendo Orai, STIM y proteínas de los canales TRPC, o indirectamente, por influir en el contenido de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RS (Trebak et al., 2010; Nunes y Demaurex, 2014). En el presente estudio, se demuestra que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de liberar  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares en las arterias coronarias lo que sugiere que puede influir indirectamente en la entrada SOC través de canales en la membrana plasmática tras la depleción de los depósitos.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a nifedipina activada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el MLV coronario exhibe las características farmacológicas clásicas de la entrada SOC en otras células, por ejemplo, inhibición por bajas concentraciones de lantánidos ( $\text{Gd}^{3+}$  50  $\mu\text{M}$ ) y reproducción mediante fluorescencia de  $\text{Ba}^{2+}$ , indicativa del influjo de  $\text{Ba}^{2+}$  a través de canales no selectivos

## DISCUSIÓN

de cationes (Parekh, 2006). Además, en el presente estudio, el nuevo derivado de pirazol e inhibidor selectivo de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por Orai1, Pyr6 (Schleifer et al., 2012) abolió la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  obtenida tras la inhibición SERCA y también la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo no L activada en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , lo que indica que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  activa la entrada SOC de manera dependiente de Orai1 en el MLV coronario. Estos datos son consistentes con observaciones recientes en varias líneas celulares que demuestran que a concentraciones micromolares, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce directamente el vaciamiento de los depósitos  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares y activa la afluencia de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por Orai1 de manera STIM1-dependiente, y tanto la entrada SOC como la corriente CRAC estimuladas por  $\text{H}_2\text{O}_2$  se reducen fuertemente por inhibición farmacológica o *knock-out* molecular del IP3R, lo que sugiere la activación de la actividad del IP3R más que la modificación de la propia Orai1/STIM1 (Grupe et al., 2010). Por otra parte, los presentes datos muestran que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  moviliza  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los depósitos y activa una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo no L en el MLV coronario, lo que está en parte en concordancia con estudios anteriores en miocitos vasculares de arterias pulmonares intralobares de la rata, donde el  $\text{H}_2\text{O}_2$  libera  $\text{Ca}^{2+}$  desde depósitos intracelulares sensibles a IP3 y a rianodina y activa una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  resistente a nifedipina y una corriente de cationes sensible a  $\text{Ni}^{2+}$  (Lin et al., 2007). Sin embargo, esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de voltaje no fue inhibida por lantánidos o bloqueantes de los TRPC, lo que sugiere por tanto que los canales TRPM2 participan en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  activado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en miocitos arteriales pulmonares (Lin et al., 2007).

Está bien establecido que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  regula vías de señalización intracelular a través de la interacción con residuos de cisteína altamente reactivos en proteínas diana, induciendo modificaciones oxidativas como la formación de puentes disulfuro reversibles, productos de oxidación como el ácido sulfénico, o la producción irreversible de ácidos sulfónicos o sulfínicos (Meng et al., 2002; Trebak et al., 2010; Bogeski et al., 2011). La maquinaria molecular que controla la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC y el contenido de los depósitos intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  contiene grupos tiol directamente modificados por las condiciones oxidantes (Trebak et al., 2010; Bogeski et al., 2011; Nunes y Demaurex, 2014). Los presentes datos sugieren que la oxidación de grupos tiol induce una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente del agotamiento de los depósitos en el MLV coronario, ya que el incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  independiente de voltaje inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero no la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por la inhibición de la SERCA con CPA, fue abolida por el reductor de grupos tiol DTT. Los presentes resultados demuestran, por tanto, la regulación redox de la *entrada capacitativa* de  $\text{Ca}^{2+}$  en las arterias coronarias, y están en consonancia con estudios funcionales previos que demuestran la regulación redox-

## DISCUSIÓN

dependiente del flujo sanguíneo coronario, incluyendo la vasodilatación metabólica mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  de los miocitos cardiacos (Saitoh et al., 2006; Saitoh et al., 2007) y la relajación mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependiente de la respuesta EDH (Wong et al., 2014) a través de la oxidación de los grupos tiol en la p38 MAPK sensible al estado redox y en la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, respectivamente.

Se han descrito diversos mecanismos moleculares que subyacen los efectos del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la oxidación tiol y la posterior modificación de los procesos implicados en la entrada SOC, incluyendo la oxidación del IP3R y el agotamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que conduce no sólo a la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  SOC, sino también la activación redox de la corriente CRAC independiente de IP3 (Elliott et al., 1989; Parekh y Penner, 1995; Redondo et al., 2004b; Grupe et al., 2010; Bogeski et al., 2011). Los presentes resultados demuestran que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  moviliza  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los depósitos sugiriendo que podría regular la actividad del IP3R y/o el RyR a través de la oxidación de grupos tiol para inducir depleción de los depósitos, como se ha mostrado anteriormente en células endoteliales humanas, donde concentraciones fisiológicas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  derivadas de la NADPH oxidasa aumentan la sensibilidad del IP3R (Hu et al., 2000), siendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por IP3R dependiente de la oxidación de grupos sulfhidrilo en el receptor IP3R (Parekh y Penner, 1995; Redondo et al., 2004b). En miocitos de arterias pulmonares, las ROS activan el RyR a través de la oxidación tiol durante la hipoxia (Du et al., 2005). De los resultados obtenidos, tampoco se puede descartar la inhibición de la actividad de la SERCA y/o la activación del NCX en el MLV coronario a través de la oxidación por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  de grupos tiol. En este sentido, estudios recientes han demostrado que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de inhibir la SERCA por sulfonación oxidativa postraducciona en Cys674 (Lancel et al., 2010) y la activación redox del NCX en miocitos cardiacos tras la exposición aguda al  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) (Kuster et al., 2010), respectivamente. Finalmente, además de movilizar  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los depósitos, estos resultados sugieren la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por Orai1 activada por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y por lo tanto un papel para las interacciones redox directas con Orai1 y/o STIM1 en la entrada SOC de las arterias coronarias. A este respecto, nuevos estudios han aclarado recientemente la regulación redox de los canales iónicos Orai1 y la proteína del RE sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  STIM1. Así, las proteínas de los canales Orai1 pero no de Orai3 son inhibidas de forma dependiente de la concentración por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través de la oxidación selectiva de la cisteína extracelular Cys195, mientras que el aumento de expresión de Orai3 reduce la sensibilidad redox de los canales CRAC en linfocitos T cooperadores humanos, lo que permite un fino ajuste de las respuestas al  $\text{Ca}^{2+}$  en condiciones de estrés oxidativo (Bogeski et al., 2010). Por otro lado, STIM 1 también es sensible al estado redox y

## DISCUSIÓN

puede ser S-glutationilada en el residuo de cisteína Cys56 en respuesta al estrés oxidativo, lo que conduce a una entrada constitutiva de  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hawkins et al., 2010).

Por lo tanto, y considerando en conjunto los resultados obtenidos en nuestro estudio, la activación redox de la entrada SOC en el MLV coronario es probablemente el resultado de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS por modificación oxidativa y la activación del IP3R, del RyR y/o la SERCA, compensada por la inhibición oxidativa de Orai1. Se necesitan investigaciones posteriores, con el fin de determinar las interacciones específicas de las ROS con la maquinaria molecular implicada en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en los depósitos intracelulares del MLV coronario.

**3. EFECTOS VASOACTIVOS DEL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> EN LAS ARTERIAS CORONARIAS DURANTE EL SÍNDROME METABÓLICO**

Aunque las ROS participan en múltiples procesos de regulación fisiológicos en la pared vascular, en determinadas condiciones patológicas los niveles de oxidantes pueden superar la capacidad de los sistemas antioxidantes y/o las defensas antioxidantes pueden verse comprometidas, desencadenándose un estado de estrés oxidativo vascular (Montezano y Touyz, 2014).

El SM representa un conjunto de factores de riesgo cardiovascular, que incluye obesidad abdominal, dislipemia, hipertensión e intolerancia a la glucosa, que aumentan el riesgo de diabetes tipo 2 y de enfermedad cardiovascular de diversa etiología, como hipertensión arterial, enfermedad coronaria aterosclerótica o hipertrofia ventricular. La patogénesis de la enfermedad cardiovascular en el SM es multifactorial, pudiendo estar causada por uno o más factores asociados con esta condición, como anormalidades sistémicas, resistencia a la insulina, diabetes y/o inflamación. Una característica común de la enfermedad cardiovascular en el SM y en los estados de resistencia a la insulina es el aumento del estrés oxidativo en el corazón. Además, los pacientes con SM presentan un daño oxidativo sistémico elevado como resultado de la sobreproducción de ROS y la disminución de la protección antioxidante (Ilkun y Boudina, 2013).

El estrés oxidativo juega un papel importante en las manifestaciones relacionadas con el SM que incluyen la aterosclerosis, la hipertensión y la diabetes tipo 2, asociándose además con la adiposidad y la resistencia a la insulina, lo que sugiere que el estrés oxidativo podría ser un acontecimiento temprano, más que una consecuencia, en la patología de estas enfermedades crónicas (Roberts y Sindhu, 2009). Así, se ha demostrado que en pacientes con enfermedad arterial coronaria el riesgo de eventos cardiovasculares se puede predecir por el estrés oxidativo (Heitzer et al., 2001). Además, el estrés oxidativo es una de las causas de disfunción endotelial en la obesidad y el SM, al comprometer la biodisponibilidad del NO endotelial, y también al alterar las relajaciones vasculares mediadas por prostanoides derivados del endotelio (Prieto et al., 2014). La dislipidemia aterogénica y la producción excesiva de ROS inducida por los ácidos grasos libres es uno de los mecanismos que subyace a la asociación entre el tejido adiposo y la disfunción endotelial en la obesidad (Inoguchi et al., 2000; Steinberger et al., 2000). El estrés oxidativo también puede contribuir a la resistencia a la insulina (Evans et al. 2005). Los ácidos grasos libres no solo causan disfunción endotelial al

## DISCUSIÓN

incrementar el estrés oxidativo en parte por activación de la NADPH oxidasa, sino que además dañan las vías de señalización de la insulina produciendo resistencia a la insulina (Rask-Madsen et al., 2012).

El corazón diabético, a pesar de los mayores niveles plasmáticos de glucosa, oxida menos glucosa y más ácidos grasos que el corazón sano. Este metabolismo energético alterado es una de las causas de disfunción cardíaca y desarrollo de miocardiopatía diabética, aumentando además la demanda de  $O_2$  y la generación de ROS. Además, la hiperglucemia aumenta el estrés oxidativo, inhibe la síntesis de NO derivado del endotelio, y acelera la proliferación de células de MLV, conduciendo todo ello a la disfunción endotelial y vascular (Serpillon et al., 2009). Por otro lado, la obesidad incrementa la oxidación cardíaca de ácidos grasos libres y reduce la oxidación de la glucosa independientemente de la diabetes en modelos experimentales de SM (Buchanan et al., 2005). La actividad de las enzimas antioxidantes en el miocardio de animales con SM se encuentra incrementada, incluyendo la SOD mitocondrial y citosólica, enzimas productoras de  $H_2O_2$  (Conti et al., 2004).

Como resultado del metabolismo aeróbico mitocondrial, y debido a los elevados requerimientos de energía del miocardio, se generan grandes cantidades de ROS, incluyendo el  $\cdot O_2^-$ , el  $HO\cdot$ , y el  $H_2O_2$ . Debido al gran número de mitocondrias existente en el miocardio y a la tensión relativamente alta de  $O_2$ , el miocardio es propenso a sufrir daño oxidativo cuando se producen desequilibrios entre la generación de especies prooxidantes y las defensas antioxidantes (Pung et al. 2012). En condiciones de estrés oxidativo, las ROS, incluido el  $H_2O_2$ , pueden participar en procesos de proliferación y remodelado vascular (Montezano y Touyz, 2012). En contraste con el miocardio, en arterias coronarias es escasa la información sobre la participación de las ROS, y en concreto del  $H_2O_2$ , en el mantenimiento de estas condiciones de estrés oxidativo y en el desarrollo de enfermedad vascular. Por tanto, como parte final de este estudio de Tesis Doctoral, se procedió a estudiar la producción de ROS en arterias coronarias y los efectos vasoactivos del  $H_2O_2$ , en condiciones de SM.

La producción basal de ROS se encuentra incrementada en arterias coronarias de animales obesos, si bien los niveles basales de  $\cdot O_2^-$  no fueron diferentes en el miocardio de RZO, donde se ha descrito un incremento compensador de las defensas antioxidantes (Conti et al., 2004). El SM clínicamente predispone al desarrollo de enfermedad cardiovascular y se ha demostrado que en estas condiciones el estrés oxidativo es mayor (Ilkun y Boudina, 2013), lo que se encuentra en consonancia con los presentes resultados que muestran un nivel basal de  $\cdot O_2^-$  mayor en arterias coronarias de animales prediabéticos, si bien en estos animales RZO

## DISCUSIÓN

todavía no se han desarrollado ni hipertensión ni hiperglucemia (Conti et al., 2004; Villalba et al., 2009). De acuerdo con los resultados obtenidos en la primera parte de este estudio que demuestra un *feedback* positivo en el que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de estimular la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$ , la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  estimulada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  estuvo incrementada de forma proporcional en ratas obesas en comparación con sus controles delgados y se redujo en presencia del *scavenger* de radicales libres tempol, demostrando así la contribución del  $\cdot\text{O}_2^-$  y del  $\text{H}_2\text{O}_2$  al estrés oxidativo de las arterias coronarias en condiciones de SM.

Diversos trabajos han demostrado que el efecto vasoconstrictor del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en condiciones patológicas está incrementado. La vasoconstricción mediada por  $\text{H}_2\text{O}_2$  es mayor en animales espontáneamente hipertensos que en animales sanos, tanto en arteria aorta (Rodríguez-Martínez et al., 1998) como en arterias mesentéricas (Gao y Lee, 2001), y dicha vasoconstricción está mediada por la liberación de  $\text{TXA}_2$  y de radicales  $\cdot\text{O}_2^-$ . En el presente trabajo, se ha demostrado un efecto vasoconstrictor del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en arterias coronarias de animales sanos, marcadamente mayor en ramas más proximales y de mayor diámetro. Aunque en arterias mesentéricas el  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce principalmente un efecto relajante, tras la despolarización de las arterias con una solución de  $\text{K}^+30$  se desenmascara un componente contráctil leve en el efecto vasoactivo del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En contraste con los resultados obtenidos en arterias mesentéricas y aorta de modelos animales de hipertensión, en el modelo de obesidad en la RZO utilizado en este estudio, no se encontraron diferencias en vasoconstricción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  ni en arterias coronarias ni en arterias mesentéricas. Estas diferencias halladas en la acción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  pueden deberse al modelo experimental utilizado, ya que en estudios previos se ha demostrado que a las 17-18 semanas de edad, la rata Zucker no ha desarrollado hipertensión ni hiperglucemia (Conti et al., 2004; Villalba et al., 2009), aunque sí presenta mayores niveles de insulina y glucosa postpandriales, constituyendo un modelo de SM y de prediabetes (Villalba et al., 2009).

Los trabajos anteriormente citados han demostrado que la vasoconstricción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en la arteria mesentérica y aorta está mediada por la activación de la vía de los prostanoideos a través de la estimulación de la COX, produciéndose un mayor efecto contráctil mediado por  $\text{TXA}_2$  en arterias de animales hipertensos (Gao y Lee, 2001; García-Redondo et al., 2009). Además, esta mayor vasoconstricción se ve acompañada de mayores incrementos en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En el presente estudio, se demuestra previamente en arterias sanas la implicación del  $\text{TXA}_2$  en la vasoconstricción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como se deduce de la menor vasoconstricción observada en presencia del inhibidor no selectivo de la COX indometacina y del antagonista de

## DISCUSIÓN

receptor TP. En arterias obesas, estos mismos agentes fueron utilizados con el fin de determinar si existe una mayor participación del TXA<sub>2</sub> en el efecto vasoconstrictor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el SM. En estas condiciones, no se desvelaron diferencias significativas en el efecto inhibitor de la indometacina ni en el del antagonista del receptor TP, lo que sugiere que no existe una mayor participación del TXA<sub>2</sub> en la vasoconstricción inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias de la RZO. Tampoco se encontró un efecto significativo del inhibidor del TXA<sub>2</sub> sobre el incremento en [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, descartando así una mayor movilización de Ca<sup>2+</sup> mediada por TXA<sub>2</sub>, a diferencia de lo observado en arterias de animales hipertensos (García-Redondo et al., 2009).

Sin embargo, en arterias coronarias de RZO, sí pudo observarse una mayor movilización de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de endotelio, lo que sugiere alteraciones en la movilización de Ca<sup>2+</sup> en el MLV de las arterias coronarias durante el SM. Del mismo modo, se ha descrito un incremento significativamente mayor en la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el MLV mesentérico de ratas espontáneamente hipertensas en comparación con animales sanos, lo que indica que la señalización del Ca<sup>2+</sup> en condiciones de enfermedad vascular está alterada (Tabet et al., 2004).

En los vasos sanguíneos sanos, la mayoría de los prostanoïdes se sintetizan a través de la COX-1, mientras que la COX-2 se considera una isoforma inducible, casi indetectable en tejidos sanos pero de inducción rápida por estímulos mitógenos, mecánicos e inflamatorios (Sánchez et al., 2010). Su expresión se regula al alza en estados de inflamación de bajo grado de la pared vascular arterial como son el envejecimiento, la hipertensión arterial, la diabetes, y la obesidad. El estrés oxidativo y las ROS pueden inducir la actividad o la expresión vascular tanto de la COX-1 como de la COX-2 (Shi y Vanhoutte, 2008; Martínez-Revelles et al., 2012; Tian et al., 2012). En concreto, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede incrementar la expresión de la COX-2 en células endoteliales y células de MLV. Además, se ha sugerido que existe una relación directa entre la expresión de la COX-2 y las ROS derivadas de la NADPH oxidasa o la mitocondria (Hernanz et al., 2014). El estrés oxidativo induce la expresión de las COX, y de modo inverso, las dos isoenzimas de la COX pueden generar ROS. En este sentido, la COX-2 es capaz de inducir la producción de ROS: en pacientes con hipertensión esencial, se ha descrito que la disfunción endotelial se debe a una reducción en la biodisponibilidad de NO, a través de una mayor producción de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> dependiente de la COX-2 (Viridis et al., 2013). Del mismo modo, Shi y Vanhoutte (2008) han demostrado que, en modelos experimentales de diabetes tipo 1, las ROS derivadas de la NADPH son capaces de inducir la regulación al alza de la expresión de la COX-1

## DISCUSIÓN

y de la COX-2. También se ha descrito que el estrés oxidativo incrementa la actividad y la expresión de la COX-2, y que representa una fuente de producción de ROS y es un mediador de disfunción endotelial en ratas con hipertensión renovascular (Tian et al., 2012).

Por ello, en el presente trabajo se evaluó si la COX-2 está implicada en las acciones vasculares del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las arterias coronarias de RZL y RZO, y en particular la posible asociación de esta enzima con la producción incrementada de ROS y el estrés oxidativo observado en las arterias de animales obesos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente una regulación al alza de la expresión de la COX-2 en la pared arterial coronaria de la RZO (Sánchez et al., 2010). En arterias coronarias con endotelio intacto, la vasoconstricción inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia del inhibidor selectivo de la COX-2 se vio significativamente reducida en animales sanos, lo que sugiere la participación de mediadores contráctiles derivados de la COX-2 en la vasoconstricción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, en animales obesos no se hallaron diferencias significativas. Al retirar el endotelio, en animales control se observó una mayor inhibición en la vasoconstricción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en animales obesos se desenmascaró un efecto vasoconstrictor mediado por la COX-2. La falta de efecto del NS398 en vasos con endotelio, en contraste al efecto inhibitor marcado en el MLV, sugiere que en condiciones de SM, la COX-2 media la producción de un prostanoides relajante del endotelio, que enmascara la liberación de mediadores contráctiles probablemente del MLV en arterias con endotelio intacto. De acuerdo con estos resultados, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado previamente que la expresión incrementada de la COX-2 en arterias coronarias de ratas obesas está acoplada a la producción basal de un prostanoides relajante derivado del endotelio (Sánchez et al., 2010). De forma similar, se ha descrito que en pacientes con diabetes mellitus, la liberación de prostanoides vasodilatadores derivados de la COX-2, posiblemente prostaciclina, se encuentra incrementada en arteriolas coronarias, desempeñando un papel protector compensador de las alteraciones de la función vascular que se producen en el curso de la diabetes (Szerafin et al., 2006).

En trabajos previos se ha descrito que en las arterias coronarias, la COX-1 se expresa de forma uniforme y en similar proporción en el endotelio de RZL y RZO, mientras que la COX-2 se expresa de forma discreta en el endotelio de RZL, y de forma importante en el músculo y en el endotelio de RZO (Sánchez et al., 2010). En el presente estudio, se confirma la expresión de la COX-2 en el endotelio de RZL, y el incremento de dicha expresión tanto en el endotelio como en el MLV coronarios de RZO. Está bien documentado que la expresión de la COX-2 está regulada al alza en condiciones de inflamación vascular como en la diabetes o la hipertensión,

## DISCUSIÓN

y dicha expresión se induce rápidamente por citoquinas, promotores tumorales y factores de crecimiento (Eligini et al., 2005). También las ROS son capaces de regular la expresión de esta enzima e inducir respuestas de tipo inflamatorio (Cheng et al., 2013). De hecho, la producción de prostaglandinas en leucocitos activados se produce en 4 horas (Reddy et al. 2000), y la expresión de la COX-2 inducida por bradicinina se produce en una hora en células del MLV de las vías respiratorias humanas (Kang et al., 2007). Los presentes resultados confirman la inducción rápida de la COX-2, tras una exposición aguda durante 45 minutos al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM): tanto en RZL como en RZO se produce un incremento en la expresión de la COX-2 en la pared vascular, y en el MLV se induce la expresión de esta enzima en animales sanos, mientras que en ratas con SM se puede observar esta expresión de forma mucho más clara tanto en el endotelio como en el MLV.

La COX-2 es una enzima cuya inducción está asociada con la inflamación, siendo además una enzima sensible al estado redox no sólo capaz de formar prostanoides, sino también radicales libres de O<sub>2</sub> (Shi y Vanhoutte, 2008). Dada la relación que existe entre la COX-2 y el estrés oxidativo, se determinó la capacidad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de regular la actividad de la COX-2 en la producción de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, mediante la evaluación del efecto inhibitor que produce el bloqueo de la COX-2 en la producción de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> tanto basal como estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La inhibición de la COX-2 indujo un efecto marcadamente inhibitor sobre la producción de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, tanto basal como estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que demuestra que la COX-2 está implicada y es en parte responsable de la producción incrementada de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la pared coronaria vascular de ratas obesas, siendo el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> capaz de inducir dicha producción, como se ha demostrado en trabajos previos en pacientes con HTA esencial (Viridis et al., 2013), ratas espontáneamente hipertensas (Martínez-Revelles et al., 2012), y ratas diabéticas (Shi y Vanhoutte, 2008).

Para confirmar la participación del ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> en el efecto vasoconstrictor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se evaluó el efecto del *scavenger* de radicales libres tempol sobre la vasoconstricción en arterias coronarias desprovistas de endotelio. Dicho tratamiento disminuyó el efecto contráctil observado de forma marcada y en mayor medida en arterias de animales con SM, demostrando que la acción vasoconstrictora del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el MLV está mediada en parte por la activación de la COX-2 y la subsiguiente formación de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> y que está incrementada en arterias coronarias de ratas obesas pero a su vez compensado por la liberación de un mediador relajante derivado del endotelio.

En el presente estudio se demuestra que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de inducir contracción que se acompaña de incrementos en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en el MLV, siendo esta movilización de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mayor

## DISCUSIÓN

en arterias coronarias de RZO. Con el fin de determinar si el  $\cdot\text{O}_2^-$  derivado de la COX-2 en el MLV e implicado en el efecto vasoconstrictor inducido por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es responsable del mayor incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , se examinó el efecto del inhibidor selectivo de esta enzima sobre los efectos del peróxido en arterias coronarias desprovistas de endotelio de ratas obesas. La inhibición de esta enzima no alteró este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a pesar de reducir la contracción, lo que sugiere que la COX-2 no está implicada en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  del músculo.

En este trabajo se demuestra que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  presenta una acción vasoconstrictora dependiente del endotelio en las arterias coronarias, capaz de activar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales tipo L y no tipo L, y mediada además por la activación de la COX, la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  derivado de la NADPH oxidasa y de la COX-2, la activación de la Rho quinasa, la p38 MAPK y la ERK MAPK. En diversos estudios previos se ha descrito la implicación de diferentes vías en la acción constrictora del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como la tirosina quinasa, los productos de la COX, la PKC, las MAPK, y la RO quinasa, vías de señalización que pueden estar implicadas en procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  (Ardanaz y Pagano, 2006). En este sentido, la ausencia de efecto sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que produce la inhibición de la COX-2 sugiere que en la acción constrictora del  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediada por  $\cdot\text{O}_2^-$  derivado de la COX-2 están implicados procesos de sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$ , posiblemente mediados por la acción de proteínas quinasa.

La  $\text{PGI}_2$  es el principal producto de la COX en el endotelio, que actúa ejerciendo diversos efectos beneficiosos sobre la integridad y funcionalidad endotelial, tanto por su efecto *per se*, como por su capacidad de contrarrestar los efectos del  $\text{TXA}_2$ . Aunque las células endoteliales expresan constitutivamente COX-1, actualmente está aceptado que la COX-2 es la principal productora de  $\text{PGI}_2$  en el endotelio vascular (McAdam et al., 1999), probablemente como resultado de la inducción de su expresión en respuesta al *shear stress*. Sin embargo, se ha descrito que en condiciones de incremento de estrés oxidativo, como es el caso de la diabetes, la COX-1 se convierte en la principal isoforma responsable de la producción endotelial de  $\text{PGI}_2$  (Toniolo et al., 2013). Con el fin de evaluar la implicación de la  $\text{PGI}_2$  en la acción relajante mediada por la COX-2, se examinó el efecto de un antagonista selectivo del receptor IP sobre el efecto vasoconstrictor del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los presentes resultados demuestran que en presencia del antagonista del receptor de la  $\text{PGI}_2$ , no se incrementa sino que se disminuye el efecto vasoconstrictor del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de forma más manifiesta en RZO, lo que sugiere que en condiciones de estrés oxidativo y disfunción vascular como es el caso del SM, la  $\text{PGI}_2$  es capaz de producir un efecto vasosconstrictor (Vanhoutte, 2011).

## DISCUSIÓN

La PGI<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub> son los principales productos del metabolismo de la COX en el endotelio microvascular coronario y una reducción en la biodisponibilidad de alguno de estos factores protectores endoteliales puede resultar en disfunción vascular, como se ha documentado en pacientes con hipertensión o diabetes (Hein et al., 2009). Se ha demostrado que la PGE<sub>2</sub> participa en el efecto protector del endotelio durante el preconditionamiento isquémico en el corazón de la rata (Bouchard et al., 2000). Asimismo, los estímulos inflamatorios son capaces de estimular la expresión de la COX-2 asociada a la producción de PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub> en células endoteliales de la arteria coronaria humana (Tan et al., 2007). Por tanto, podría sugerirse que la PGE<sub>2</sub> está implicada en el efector relajante del endotelio mediado por la COX-2 en arterias coronarias de ratas obesas.

### *Alteraciones en la acción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la entrada de Ca<sup>2+</sup> en las arterias coronarias durante el Síndrome Metabólico*

El estrés oxidativo subyace a la patogénesis de la enfermedad vascular en la diabetes, la obesidad y otros estados de resistencia a la insulina. Por otro lado, se ha sugerido la implicación crítica de una homeostasis anormal de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en células de MLV en la patogénesis del remodelado y disfunción vascular y del incremento en la vasoconstricción producida en la diabetes y otros estados de resistencia a la insulina, incluyendo la obesidad y la hipertensión (Touyz, 2005; Villalba et al., 2008; Contreras et al., 2013). Sin embargo, las relaciones entre el estrés oxidativo y las alteraciones en el metabolismo del Ca<sup>2+</sup> de la pared vascular en condiciones de enfermedad vascular no están completamente dilucidadas.

Los presentes hallazgos confirman niveles elevados de estrés oxidativo tanto basales como estimulados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las arterias coronarias de RZO, y estos resultados están en consonancia con los altos niveles de ROS descritos en el miocardio de dichos animales (Serpillon et al., 2009), a pesar del aumento compensatorio de las defensas antioxidantes, incluyendo las SOD citosólica y mitocondrial y enzimas generadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Conti et al., 2004). En miocitos cardíacos de la RZO se han descrito alteraciones del metabolismo del Ca<sup>2+</sup>, con una reducción de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L y la regulación al alza de los genes que codifican canales Cav1.2 (Howarth et al., 2011). Los datos del presente estudio muestran que ni el aumento de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por la despolarización con K<sup>+</sup> ni los niveles de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> basales implicados en el tono coronario en reposo, ambos dependientes de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de tipo L sensibles a nifedipina, se vieron alterados en arterias coronarias de RZO en

## DISCUSIÓN

comparación con sus controles. Estos datos sugieren que inicialmente la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L dependientes de voltaje se encuentra conservada en el MLV coronario de las RZO.

Sin embargo, la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares y la entrada SOC obtenidas tras la exposición aguda al  $\text{H}_2\text{O}_2$  se vieron incrementadas en arterias de ratas obesas en comparación con sus controles, como demuestra el mayor incremento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y por la mayor entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de voltaje inducida por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{M}$ . Estos hallazgos sugieren que las respuestas de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS y la entrada tipo SOC activadas por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno se sensibilizan en condiciones de aumento de los niveles locales de ROS en la pared vascular. Por el contrario, la entrada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependiente de los depósitos, obtenida por el agotamiento pasivo del RS por la inhibición de la SERCA con CPA, es inhibida en arterias coronarias de RZO. Estos hallazgos son consistentes con la reducción de la *entrada capacitativa* de  $\text{Ca}^{2+}$  descrita en arteriolas de la retina (Curtis et al., 2003) y en miocitos arteriales de la arteria caudal de la rata (Mita et al., 2010) de modelos experimentales de diabetes tipo 1 y 2, respectivamente, lo que apoya el concepto de que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por la depleción de los depósitos independiente de voltaje se encuentra reducido en la pared arterial en condiciones de estrés oxidativo en estados de resistencia a la insulina y diabetes. Esta reducción de la entrada SOC se ha atribuido a una mayor actividad de la PKC (Curtis et al., 2003) y está asociada a una regulación al alza de los canales TRPC1 (Mita et al., 2010). Se ha demostrado recientemente que la transcripción de STIM1 y Orai1 puede ser incrementada por la unión directa del promotor del NF- $\kappa$ B, factor de transcripción sensible al estado redox y con un importante papel en la inflamación (Eylenstein et al., 2012). Dado que niveles bajos de ROS activan la actividad del NF- $\kappa$ B, mientras que niveles más altos son inhibitorios (Jing et al., 2006), se ha sugerido que la regulación a la baja de las proteínas STIM/Orai a través de la inhibición oxidativa del NF- $\kappa$ B podría servir como mecanismo de protección durante el estrés oxidativo (Nunes y Demaurex, 2014). Esto sería coherente con la reducción de la entrada SOC mediada por Orai1 encontrada en el MLV coronario de ratas obesas resistentes a la insulina, y también en arterias de ratas de modelos de diabetes tipo 1 y 2 (Curtis et al., 2003; Mita et al., 2010).

## **VI. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se han evaluado las acciones vasoactivas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los mecanismos de señalización de Ca<sup>2+</sup> en las arterias coronarias, así como sus alteraciones en un modelo experimental de Síndrome Metabólico. De los resultados obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posee un efecto vasoconstrictor en las arterias coronarias que está relacionado con el diámetro vascular, siendo más relevante en los segmentos arteriales proximales, mientras que en las ramas más distales predomina el efecto relajante.
2. El efecto vasoconstrictor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las arterias coronarias incluye la activación de la COX y del receptor TP, así como la estimulación de la Rho quinasa y de las MAPK. Este efecto contráctil del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está acoplado fundamentalmente a la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de Ca<sup>2+</sup> voltaje-dependientes tipo L en el MLV coronario, de forma similar a lo que sucede en los miocitos cardiacos.
3. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimula la generación de aniones ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> a través de la NADPH oxidasa, vía de señalización intracelular activada también en el miocardio, contribuyendo además el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> al efecto vasoconstrictor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
4. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> moviliza Ca<sup>2+</sup> de los depósitos intracelulares y activa una entrada de Ca<sup>2+</sup> no dependiente de voltaje, que es inhibida a concentraciones micromolares elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y presenta los rasgos farmacológicos clásicos de la entrada tipo SOC caracterizada en otras células, siendo inhibida por gadolinio y reproducida por la fluorescencia de bario. Esta entrada de Ca<sup>2+</sup> implica la activación específica de la proteína Orai1.
5. La entrada de Ca<sup>2+</sup> tipo SOC en el MLV coronario activada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es sensible al estado redox y se produce como consecuencia de la oxidación de grupos tiol.
6. La producción de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> tanto endógena basal como estimulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> están incrementadas en arterias coronarias de ratas con SM. En estas condiciones, el efecto vasoconstrictor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se encuentra alterado e implica la activación de la COX y del receptor TP, a pesar de que la entrada de Ca<sup>2+</sup> activada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sí está incrementada con respecto a las arterias de animales control.
7. La inhibición de la enzima COX-2 reduce la vasoconstricción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias de ratas control, sin afectar la de los animales con SM. La ausencia de endotelio vascular desenmascara un efecto contráctil mediado por COX-2 en arterias de ambos tipos de animales, lo que sugiere la participación de prostanoides tanto contráctiles como relajantes derivados de la COX-2 en animales con SM. El efecto

## CONCLUSIONES

relajante del endotelio dependiente de la COX-2 no está mediado por la activación del receptor IP.

8. La expresión incrementada de la COX-2 en la pared arterial coronaria de ratas con SM se ve aumentada tras la exposición aguda al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , especialmente en el MLV. La COX-2 está implicada en la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  activada por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de forma más marcada en dichos animales, participando los aniones  $\cdot\text{O}_2^-$  en la contracción inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el MLV.
9. La activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes tipo L y su modulación por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no parecen estar afectados en arterias coronarias de ratas con SM. Sin embargo, tanto la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC inducida por la exposición aguda al  $\text{H}_2\text{O}_2$  sí se encuentran incrementadas en condiciones de SM, aunque no así la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  SOC obtenida por inhibición de la SERCA y depleción pasiva del RS, que están reguladas a la baja en animales en ratas obesas.

### Conclusión final

Los resultados obtenidos confirman la importancia de la regulación redox del flujo sanguíneo coronario y aportan nuevos datos que implican a las ROS en la regulación de la vasoconstricción coronaria y las vías de señalización que participan en dicha regulación. Asimismo, se establecen los mecanismos de la regulación redox de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por depósito no acoplada a contracción. En condiciones patológicas de estrés oxidativo y disfunción vascular, como es el caso del Síndrome Metabólico, las arterias coronarias van a estar protegidas por mecanismos que compensan los efectos vasoactivos potencialmente perjudiciales de las ROS mediante la activación de vías relajantes dependientes de la COX-2 que neutralizarían la vasoconstricción incrementada, mediante una modulación a la baja de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo SOC.

CONCLUSIONES

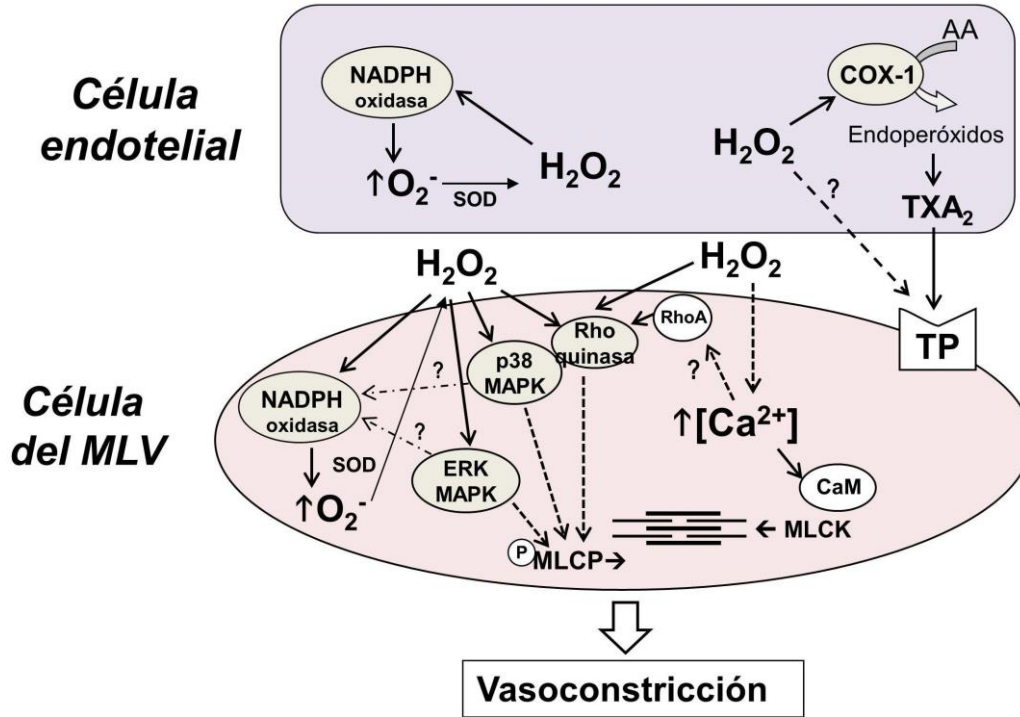


Figura XXII. Mecanismos de transducción de señales propuestos para la contracción inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias.

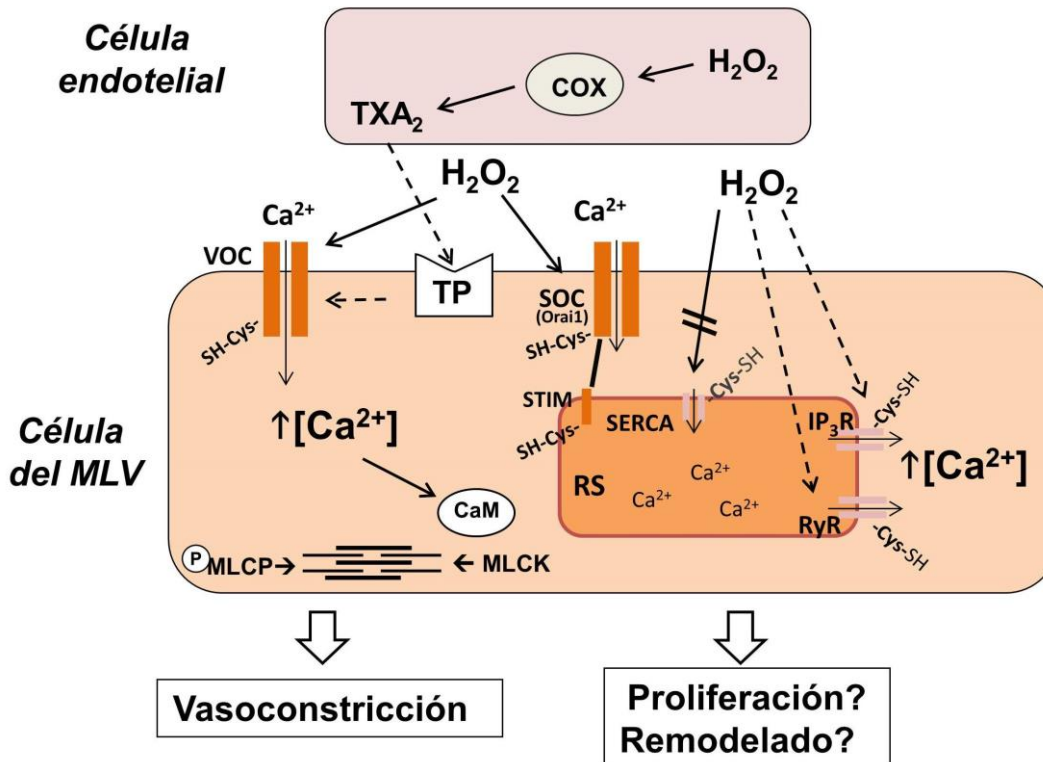


Figura XXIII. Mecanismos propuestos para el incremento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en arterias coronarias.

CONCLUSIONES

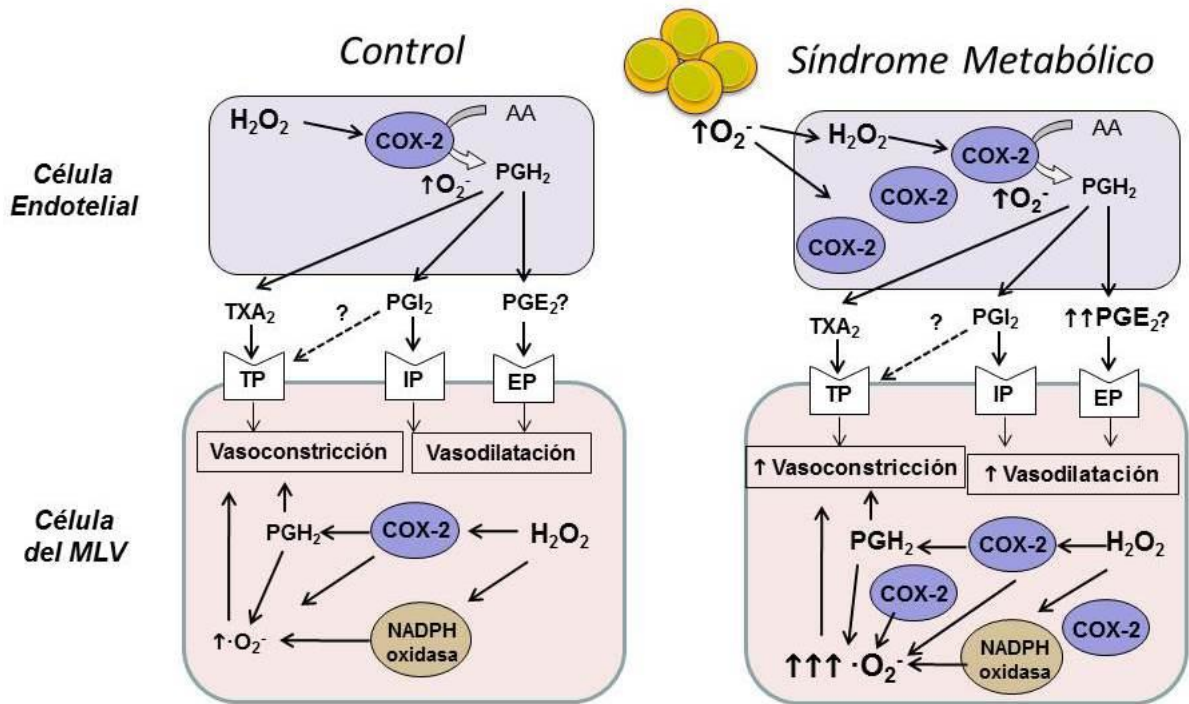


Figura XXIV. Mecanismos de transducción de señales propuestos para la contracción inducida por  $H_2O_2$  dependiente de COX-2 en arterias coronarias en condiciones de Síndrome Metabólico.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Abdullaev I, Bisaillon J, Potier M, Gonzalez J, Motiani R, Trebak M. (2008) Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res.* 103(11):1289–1299.
- Abel E, Litwin S, Sweeney G. (2008) Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev.* 88(2):389–419.
- Abid M, Kachra Z, Spokes K, Aird W. (2000) NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration, *FEBS Letters.* FEBS Lett. 486(3):252–256.
- Abramowitz J, Aydemir–Koksoy A, Helgason T, Jemelka S, Odeunmi T, Seidel C, Allen J. (2000) Expression of plasma membrane calcium ATPases in phenotypically distinct canine vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 32(5):777–789.
- Acker H, Xue D. (1995) Mechanisms of O<sub>2</sub> sensing in the carotid-body in comparison with other O<sub>2</sub> sensing cells. *News Physiol Sci.* 10(5):211–216.
- Adachi T, Weisbrod R, Pimentel D, Ying J, Sharov V, Schoneich C, Cohen R. (2004) S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med.* 10(11):1200–1207.
- Akar F, Aon M, Tomaselli G, O'Rourke B. (2005) The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J Clin Invest.* 115(12):3527–3535.
- Albelda SM, Smith CW, Ward PA. (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8(8):504–512.
- Albina J, Reichner J. (1998) Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.* 17(1):39–53.
- Alp N, Channon K. (2004) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(3):413–420.
- Amberg GC, Bonev AD, Rossow CF, Nelson MT, Santana LF. (2003) Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle during hypertension. *J Clin Invest.* 112(5):717–724.
- American Diabetes Association. (2010) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 33(Suppl. 1):S62–S69.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin C, Iii JWP, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD. (2009) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.* 119(3):573–581.
- Anderson J, Mortensen O, Peters G, Drake P, Iversen L, Olsen O, Jansen P, Andersen H, Tonks N, Moller N. (2001) Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol.* 21(21):7117–7136.
- Andrukhiv A, Costa A, West I, Garlid K. (2006) Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(5):H2067–H2074.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arbel Y, Havakuk O, Halkin A, Revivo M, Berliner S, Herz I, Weiss-Meilik A, Sagy Y, Keren G, Finkelstein A, Banai S. (2015) Relation of metabolic syndrome with long-term mortality in acute and stable coronary disease. *Am J Cardiol.* 115(3):283–287.
- Arbiser J, Petros J, Klafter R, Govindajaran B, McLaughlin E, Brown L, Cohen C, Moses M, Kilroy S, Arnold R, Lambeth J. (2002) Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(2):715–720.
- Ardanaz N, Beierwaltes W, Pagano P. (2007) Comparison of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced vasoconstriction in the abdominal aorta and mesenteric artery of the mouse. *Vascul Pharmacol.* 47(5-6):288–294.
- Ardanaz N, Pagano PJ. (2006) Hydrogen Peroxide as a Paracrine Vascular Mediator: Regulation and Signaling Leading to Dysfunction. *Exp Biol Med (Maywood).* 231(3):237–251.
- Az-ma T, Saeki N, Yuge O. (1999) Cytosolic Ca<sup>2+</sup> movements of endothelial cells exposed to reactive oxygen intermediates: role of hydroxyl radical-mediated redox alteration of cell-membrane Ca<sup>2+</sup> channels. *Br J Pharmacol.* 126(6):1462–1470.
- Baartscheer A, Schumacher C, van Borren M, Belterman C, Coronel R, Opthof T, Fiolet J. (2005) Chronic inhibition of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovasc Res.* 65(1):83–92.
- Bagi Z, Feher A, Beleznai T. (2009) Preserved coronary arteriolar dilatation in patients with type 2 diabetes mellitus: Implications for reactive oxygen species. *Pharmacol Rep.* 61(1):99–104.
- Bagi Z, Feher A, Cassuto J. (2012) Microvascular responsiveness in obesity: implications for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 165(3):544–560.
- Bagi Z, Toth E, Koller A, y Kaley G. (2004) Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH(4). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(2):H626–33.
- Bakker W, Eringa E, Sipkema P, van Hinsbergh V. (2009) Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res.* 335(1):165–189.
- Ball S, Field M, Tippins J. (2010) Regulation of thromboxane receptor signaling at multiple levels by oxidative stress-induced stabilization, relocation and enhanced responsiveness. *PLoS ONE.* 5(9):e12798.
- Balzer M, Lintschinger B, Groschner K. (1999) Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 42(2):543–549.
- Barja G. (2004) Free radicals and aging. *Trends Neurosci.* 27(10):595–600.
- Barlow RS, El-mowafy AM, White RE, Robert S. (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> opens BK<sub>Ca</sub> channels via the PLA<sub>2</sub>-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279(2):475–483 Barlow R, White R. (1998) Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BK<sub>Ca</sub> channel activity. *Am J Physiol.* 275(4):1283–1289.
- Barrera-ramírez CF, Escaned J. (2005) Fisiología coronaria y su utilidad para el cardiólogo intervencionista: Medición invasiva de la presión y flujo coronarios. *Arch Cardiol Mex.* 75(3):335–349.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barritt G. (1999) Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  inflow in animal cells: A variety of pathways tailored to meet different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling requirements. *Biochem Pharmacol.* 337(Pt2):153–169.
- Bartosz G. (2009) Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 77(8):1303–1315.
- Bathori G, Csordas G, Garcia-Perez C, Davies E, Hajnoczky G. (2006)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of the permeability properties of the mitochondrial outer membrane and voltage-dependent anion-selective channel (VDAC). *J Biol Chem.* 281(25):17347–17358.
- Beech D. (2012) Orai1 calcium channels in the vasculature. *Pflugers Arch.* 463(5):635–647.
- Beltrán A, Briones A, García-Redondo A, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso M, Martínez-González J, Salaices M. (2009) p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.* 27(1):142–154.
- Berg A, Scherer P. (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 96(9):939–949.
- Bergdahl A, Gomez M, Wihlborg A, Erlinge D, Eyjolfson A, Xu S, Beech D, Dreja K, Hellstrand P. (2005) Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: Correlation with store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Am J Physiol Cell Physiol.* 288(4):C872–C880.
- Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina M, Golovina V. (2008)  $\text{Ca}^{2+}$  handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295(3):C779–C790.
- Berridge M. (2002) The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium.* 32(5-6):235–249.
- Berridge M. (2008) Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol.* 586(Pt21):5047–5061.
- Berridge M, Bootman M, Roderick H. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7):517–529.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1):11–21.
- Berry C, Hare J. (2004) Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 16(555):589–606.
- Bessac B, Sivula M, von Hehn C, Escalera J, Cohn L, Jordt S. (2008) TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest.* 118(5):1899–1910.
- Bisaillon J, Motiani R, Gonzalez-Cobos J, Potier M, Halligan K, Alzawahra W, Barroso M, Singer H, Jourdeuil D, Trebak M. (2010) Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298(5):C993–1005.
- Blaich A, Welling A, Fischer S, Wegener J, Köstner K, Hofmann F, Moosmang S. (2010) Facilitation of murine cardiac L-type  $\text{CaV}1.2$  channel is modulated by calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of S1512 and S1570. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(22):10285–10289.
- Bogeski I, Kappl R, Kummerow C, Gulaboski R, Hoth M, Niemeyer B. (2011) Redox regulation of calcium ion channels: chemical and physiological aspects. *Cell Calcium.* 50(5):407–23.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bogeski I, Kummerow C, Al-Ansary D, Schwarz E, Koehler R, Kozai D, Takahashi N, Peinelt C, Griesemer D, Bozem M, Mori Y, Hoth M, Niemeyer B. (2010) Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci Signal.* 3(115):ra24.
- Bolla M, Matrougui K, Loufrani L, Maclouf J, Levy B, Levy-Toledano S, Habib A, Henrion D. (2002) p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane-induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res.* 39(4):353–360.
- Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. (2015) Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Agind Dis.* 6(2):109–120.
- Bootman M, Taylor C, Berridge M. (1992) The thiol reagent, thimerosal, evokes  $\text{Ca}^{2+}$  spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem.* 267(35):25113–25119.
- Boraso A, Williams A. (1994) Modification of the gating of the cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -release channel by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and dithiothreitol. *Am J Physiol.* 267(3 Pt 2):H1010–H1016.
- Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. (2000) Participation of prostaglandin E2 in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning in isolated rat heart. *Cardiovasc Res.* 45(2):418–427.
- Boutros T, Chevet E, y Metrakos P. (2008) Mitogen-activated protein (MAP) kinase/ MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev.* 60(3):261–310.
- Brandes R. (2005) Triggering mitochondrial radical release: a new function for NADPH oxidases. *Hypertension.* 45(5):847–848.
- Brandman O, Liou J, Park W, Meyer T. (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  levels. *Cell.* 131(7):1327–1339.
- Braz J, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball T, Lorenz J, Nairn A, Liggett S, Bod, Wang S, Schwartz A, Lakatta E, DePaoli-Roach, AA Robbins J, Hewett T, Bibb J, Westfall M, Kranias E, Molkentin J. (2004) PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 10(3):248–254.
- Brennan J, Bardswell S, Burgoyne J, Fuller W, Schroder E, Wait R, Begum S, Kentish J, Eaton P. (2006) Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *J Biol Chem.* 281(31):21827–21836.
- Bretón-Romero R, Lamas S. (2014) Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biol.* 2:529–534.
- Brueggemann L, Markun D, Henderson K, Cribbs L, Byron K. (2006) Pharmacological and electrophysiological characterization of store-operated currents and capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 317(2):488–499.
- Bryan N, Bian K, Murad F. (2009) Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed).* 14:1–18.
- Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, Cooksey RC, Litwin SE, Abel ED. (2005) Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology.* 146(12):5341–9.

## BIBLIOGRAFÍA

- Burke T, Wolin M. (1987) Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol.* 252(4):721–732.
- Caceres A, Brackmann M, Elia M, Bessac B, Del Camino D, D'Amours M, Witek J, Fanger C, Chong J, Hayward N, Homer R, Cohn L, Huang X, Moran M, Jordt S. (2009) A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(22):9099–9104.
- Cai H. (2005) Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* 68(1):26–36.
- Cai H, Harrison D. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87(10):840–844.
- Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SCJ. (2003) Akt-Dependent Phosphorylation of Serine 1179 and Mitogen- Activated Protein Kinase Kinase / Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 / 2 Cooperatively Mediate Activation of the Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Hydrogen Peroxide. *Mol Pharmacol.* 63(2):325–331.
- Camici P, Crea F. (2007) Coronary microvascular dysfunction. *N Engl J Med.* 356:830–840.
- Campbell W, Falck J. (2007) Arachidonic acid metabolites as endothelium- derived hyperpolarizing factors. *Hypertension.* 49(3):590–596.
- Campbell D, Stamler J, Strauss H. (1996) Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol.* 108(4):277–293.
- Cardillo C, Campia U, Iantorno M, Panza J. (2004) Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. *Hypertension.* 43(1):36–40.
- Cascino T, Csanyi G, Al Ghoulé I, Montezano A, Touyz R, Haurani M, Pagano P. (2011) Adventitia-derived hydrogen peroxide impairs relaxation of the rat carotid artery via smooth muscle cell p38 mitogen-activated protein kinase. *Antioxid Redox Signal.* 15(6):1507–1515.
- Catterall W. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:521–555.
- Cave A, Brewer A, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve D, Walker S, Shah A. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 8(5-6):691–728.
- Cersosimo E, DeFronzo R. (2006) Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev.* 22(6):423–436.
- Chamley-Campbell J, Campbell G, Ross R. (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev.* 59(1):1–61.
- Chaplin N, Amberg G. (2012) Hydrogen peroxide mediates oxidant-dependent stimulation of arterial smooth muscle L-type calcium channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(9):C1382–C1393.
- Cheng SE, Lee IT, Lin CC, Wu WL, Hsiao L Der, Yang CM. (2013) ATP Mediates NADPH Oxidase/ROS Generation and COX-2/PGE<sub>2</sub> Expression in A549 Cells: Role of P2 Receptor-Dependent STAT3 Activation. *PLoS ONE.* 8(1):e54125.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chillian W. (1997) Coronary microcirculation in health and disease. *Circulation*. 95(2):522–8.
- Cioffi D. (2011) Redox regulation of endothelial canonical transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal*. 15(6):1567–82.
- Clapham D, Julius D, Montell C, Schultz G. (2005) International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*. 57(4):427–450.
- Clapham D, Montell C, Schultz G, Julius D. (2003) International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev*. 55(4):591–596.
- Clapham D. (1995) Calcium signaling. *Cell*. 80(2):259–68.
- Clapham D. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 426(6966):517–24.
- Clapham D. (2007) Calcium signaling. *Cell*. 131(6):1047–58.
- Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. (2002) Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem*. 277(5):3101–8.
- Conti M, Renaud IM, Poirier B, Michel O, Belair M-F, Mandet C, Bruneval P, Myara I, Chevalier J. (2004) High levels of myocardial antioxidant defense in aging nondiabetic normotensive Zucker obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 286(4):R793–R800.
- Contreras C, Sánchez A, García-Sacristán A, Martínez M, Andriantsitohaina R, Prieto D. (2011) Preserved insulin vasorelaxation and up-regulation of the Akt/eNOS pathway in coronary arteries from insulin resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis*. 217(2):331–339.
- Contreras C, Sánchez A, Martínez P, Climent B, Benedito S, García-Sacristán A, Hernández M, Prieto D. (2013) Impaired endothelin calcium signaling coupled to endothelin type B receptors in penile arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *J Sex Med*. 10(9):2141–53.
- Cox R, Lozinskaya I, Dietz N. (2003) Calcium exerts a larger regulatory effect on potassium<sup>+</sup> channels in small mesenteric artery myocytes from spontaneously hypertensive rats compared to Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens*. 16(1):21–7.
- Curtis T, Major E, Trimble E, Scholfield C. (2003) Diabetes-induced activation of protein kinase C inhibits store-operated Ca<sup>2+</sup> uptake in rat retinal microvascular smooth muscle. *Diabetologia*. 46(9):1252–9.
- Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 52(4):601–23.
- Dammanahali K, Sun Z. (2008) Endothelins and NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 35(1):2–6.
- De Vriese A, Verbeuren T, Van de Voorde J, Lameire N, Vanhoutte P. (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol*. 130(5):963–974.
- DeHaven W, Smyth J, Boyles R, Putney JJ. (2007) Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels. *J Biol Chem*. 282(24):17548–56.

## BIBLIOGRAFÍA

- Denu J, Tanner K. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*. 37:5633–5642.
- Deshpande N, Sorescu D, Seshiah P, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Griendling K. (2002) Mechanism of hydrogen peroxide-induced cell cycle arrest in vascular smooth muscle. *Antioxid Redox Signal*. 4(5):845–854.
- Dietrich A, Kalwa H, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Salanova B, Pinkenburg O, Dubrovskaya G, Essin K, Gollasch M, Birnbaumer L, Gudermann T. (2007) Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1. *Pflugers Arch*. 455(3):465–77.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T. (2003) N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*. 278(48):47842–52.
- Ding D, Chapman A, Boyd R, Wang H. (2007) ERK activation contributes to regulation of spontaneous contractile tone via superoxide anion in isolated rat aorta of angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292(6):H2997–H3005.
- Dobrian A, Lieb D, Cole B, Taylor-Fishwick D, Chakrabarti S, Nadler J. (2011) Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res*. 50(1):115–131.
- Dora K. (2010) Coordination of vasomotor responses by the endothelium. *Circ J*. 74(2):226–232.
- Droge W. (2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev*. 82(1):47–95.
- Du W, Frazier M, McMahon TJ, Eu JP. (2005) Redox Activation of Intracellular Calcium Release Channels (Ryanodine Receptors) in the Sustained Phase of Hypoxia-Induced Pulmonary Vasoconstriction. *Chest*. 128(6 Suppl):556S–558S.
- Duchen M. (2000) Mitochondria and Ca<sup>2+</sup> in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium*. 28(5-6):339–348.
- Durier S, Fassot C, Laurent S, Boutouyrie P, Couetil J, Fine E, Lacolley P, Dzau V, Pratt R. (2003) Physiological genomics of human arteries: quantitative relationship between gene expression and arterial stiffness. *Circulation*. 108(15):1845–1851.
- Eager K, Dulhunty A. (1998) Activation of the cardiac ryanodine receptor by sulfhydryl oxidation is modified by Mg<sup>2+</sup> and ATP. *J Membr Biol*. 163(1):9–18.
- Eder P, Molkentin J. (2011) TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 108(2):265–272.
- Eder P, Probst D, Rosker C, Poteser M, Wolinski H, Kohlwein S, Romanin C, Groschner K. (2007) Phospholipase C-dependent control of cardiac calcium homeostasis involves a TRPC3-NCX1 signaling complex. *Cardiovasc Res*. 73(1):111–119.
- Edwards D, Li Y, Griffith T. (2008) Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28(10):1774–1781.
- Edwards G, Dora K, Gardener M, Garland C, Weston A. (1998) K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*. 396(6708):269–272.

## BIBLIOGRAFÍA

- Edwards G, Félétou M, Weston A. (2010) Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Arch.* 459(6):863–879.
- Eguchi S, Dempsey P, Frank G, Motley E, Inagami T. (2001) Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem.* 276(11):7957–7962.
- Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank G, Motley E, Eguchi K, Marumo F, Hirata Y, Inagami T. (1999) Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 274(52):36843–36851.
- Eligini S, Stella Barbieri S, Cavalca V, Camera M, Brambilla M, De Franceschi M, Tremoli E, Colli S. (2005) Diversity and similarity in signaling events leading to rapid Cox-2 induction by tumor necrosis factor- $\alpha$  and phorbol ester in human endothelial cells. *Cardiovascular Research.* 65(3):683–693.
- Elliott S, Eskin S, Schilling W. (1989) Effect of t-butyl-hydroperoxide on bradykinin-stimulated changes in cytosolic calcium in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 264(7):3806–3810.
- Ellis A, Cheng Z, Li Y, Jiang Y, Yang J, Pannirselvam M, Ding H, Hollenberg M, Triggle C. (2008) Effects of a Western diet versus high glucose on endothelium-dependent relaxation in murine micro- and macro-vasculature. *Eur J Pharmacol.* 601(1-3):111–117.
- Endemann D, Schiffrin E. (2004) Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 15(8):183–192.
- Erdei N, Bagi Z, Edes I, Kaley G, Koller A. (2007) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increases production of constrictor prostanoids in smooth muscle leading to enhanced arteriolar tone in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(1):H649–H656.
- Erdei N, Tóth A, Pásztor E, Papp Z, Edes I, Koller A, Bagi Z. (2006) High-fat diet-induced reduction in nitric oxide- dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(5):H2107–H2115.
- Erdős B, Miller A, Busjia D. (2002) Impaired endothelium- mediated relaxation in isolated cerebral arteries from insulin-resistant rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282(6):H2060–H2065.
- Evans J, Maddux B, Goldfine I. (2005) The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal.* 7(7-8):1040–1052.
- Eylenstein A, Schmidt S, Gu S, Yang W, Schmid E, Schmidt EM, Alesutan I, Sztejn K, Regel I, Shumilina E, Lang F. (2012) Transcription factor NF- $\kappa$ B regulates expression of pore-forming Ca<sup>2+</sup> channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca<sup>2+</sup> entry and affect cellular functions. *J Biol Chem.* 287(4):2719–2730. doi:10.1074/jbc.M111.275925
- Favero TG, Zable AC, Abramson JJ. (1995) Hydrogen Peroxide Stimulates the Ca<sup>2+</sup> Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem.* 270(43):25557–25563.
- Feher A, Rutkai I, Beleznai T, Ungvari Z, Csiszar A, Edes I, Bagi Z. (2010) Caveolin-1 limits the contribution of BK<sub>Ca</sub> channel to EDHF-mediated arteriolar dilation: implications in diet-induced obesity. *Cardiovasc Res.* 87(4):732–739.
- Feletou M. (2009) Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br J Pharmacol.* 156(4):545–562.
- Feletou M, Huang Y, Vanhoutte P. (2010) Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch.* 459(6):941–50.

## BIBLIOGRAFÍA

- Félétoú M, Huang Y, Vanhoutte P. (2011) Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 164(3):894–912.
- Félétoú M, Köhler R, Vanhoutte P. (2010) Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep.* 12(4):267–275.
- Féletou M, Vanhoutte P. (2009) EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* 117(4):139–155.
- Féletou M, Vanhoutte P. (1988) Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 93(3):515–524.
- Félétoú M, Verbeuren TJ, Vanhoutte P. (2009) Endothelium-dependent contractions in SHR: A tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol.* 156(4):563–574.
- Ferri C, Bellini C, Desideri G, Baldoncini R, Properzi G, Santucci A, De Mattia G. (1997) Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 105 Suppl:38–40.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S, Tanasa B, Hogan P, Lewis R, Daly M, Rao A. (2006) A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 441(7090):179–185.
- Firth A, Remillard C, Yuan J. (2007) TRP channels in hypertension. *Biochim Biophys Acta.* 1772(8):895–906.
- Fitzpatrick F. (2004) Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des.* 10(6):577–588.
- Fleming I, Busse R. (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284(1):R1–12.
- Flemming R, Cheong A, Dedman A, Beech D. (2002) Discrete store-operated calcium influx into an intracellular compartment in rabbit arteriolar smooth muscle. *J Physiol.* 543:455–464.
- Florea SM, Blatter L. (2008) The effect of oxidative stress on Ca<sup>2+</sup> release and capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in vascular endothelial cells. *Cell Calcium.* 43(4):405–415.
- Focardi M, Dick G, Picchi A, Zhang C, Chilian W. (2007) Restoration of coronary endothelial function in obese Zucker rats by a low- carbohydrate diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(5):H2093–9.
- Förstermann U, Münzel T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 113(13):1708–1714.
- Foskett J, White C, Cheung K, Mak D. (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiol Rev.* 87(2):593–658.
- Foster D, Van Eyk J, Marbán E, O'Rourke B. (2009) Redox signaling and protein phosphorylation in mitochondria: progress and prospects. *J Bioenerg Biomembr.* 41(2):159–168.
- Frank G, Eguchi S, Yamakawa T, Tanaka S, Inagami T, Motley E. (2000) Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology.* 141(9):3120–6.
- Frazziano G, Champion H, Pagano P. (2012) NADPH oxidase-derived ROS and the regulation of pulmonary vessel tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302(11):H2166–77.

## BIBLIOGRAFÍA

- Frisbee J. (2007) Obesity, insulin resistance, and microvessel density. *Microcirculation*. 14(4-5):289–98.
- Frisbee J, Stepp D. (2001) Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281(3):H1304–11.
- Fujimoto S, Asano T, Sakai M, Sakurai K, Takagi D, Yoshimoto N, Itoh T. (2001) Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery. *Eur J Pharmacol*. 412(3):291–300.
- Fulop T, Jebelovszki E, Erdei N, Szerafin T, Forster T, Edes I, Koller A, Bagi Z. (2007) Adaptation of vasomotor function of human coronary arterioles to the simultaneous presence of obesity and hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27(11):2348–54.
- Funk C, Chen X, Johnson E, Zhao L. (2002) Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 68-69:303–312.
- Furchgott R, Zawadzki J. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288(5789):373–376.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 114(12):1752–1761.
- Galle J, Heinloth A, Wanner C, Heermeier K. (2001) Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int Suppl*. 78:S120–S123.
- Gao Y, Hirota S, Zhang D, Janssen LJ, Lee RMKW. (2003) Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol*. 138(6):1085–1092.
- Gao Y, Lee R. (2001) Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A<sub>2</sub> production. *Br J Pharmacol*. 134(8):1639–1646.
- Gao Y, Lee R. (2005) Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. *Br J Pharmacol*. 146(8):1061–1068.
- Gao Y, Zhang Y, Hirota S, Janssen L, RM L. (2004) Vascular relaxation response to hydrogen peroxide is impaired in hypertension. *Br J Pharmacol*. 142(1):143–149.
- García-Redondo AB, Briones AM, Beltrán AE, Alonso MJ, Simonsen U, Salaices M. (2009) Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, and superoxide anion levels. *J Pharmacol Exp Ther*. 328(1):19–27.
- Gerthoffer W. (2007) Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 100(5):607–621.
- Giles T. (2006) Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 8(12 Suppl 4):2–16.
- Gill D, Spassova M, Soboloff J. (2006) Signal transduction. Calcium entry signals—trickles and torrents. *Science*. 313(5784):183–184.
- Gill J, McKenna W, Camm A. (1995) Free radicals irreversibly decrease Ca<sup>2+</sup> currents in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*. 292(3-4):337–340.

## BIBLIOGRAFÍA

- Godin C, Caprani A, Dufaux J, Flaud P. (1993) Interactions between neutrophils and endothelial cells. *J Cell Sci.* 106(Pt 2):441–451.
- Goldhaber J. (1996) Free radicals enhance  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 271(3 Pt 2):H823–33.
- Gomez-Alamillo C, Juncos L, Cases A, Haas J, Romero J. (2003) Interactions between vasoconstrictors and vasodilators in regulating hemodynamics of distinct vascular beds. *Hypertension.* 42(4):831–6.
- Goodwill A, James M, Frisbee J. (2008) Increased vascular thromboxane generation impairs dilation of skeletal muscle arterioles of obese Zucker rats with reduced oxygen tension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(4):H1522–H1528.
- Gordon J, Shaw J, Kirshenbaum L. (2011) Multiple facets of NF- $\kappa$ B in the heart: to be or not to NF- $\kappa$ B. *Circ Res.* 108(9):1122–32.
- Grankvist K, Marklund S, Täljedal I. (1981) CuZn- superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione-peroxidase in pancreatic-islets and other tissues in the mouse. *Biochemistry.* 199(2):393–398.
- Griendling K. (2006) NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal.* 8(9-10):1443–1445.
- Griendling K, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. (2000) Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(10):2175–83.
- Griendling K, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H Oxidase : Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ Res.* 86(5):494–501.
- Griffith T, Chaytor A, Edwards D. (2004) The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. *Pharmacol Res.* 49(6):551–64.
- Grimsrud P, Xie H, Griffin T, Bernlohr D. (2008) Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol Chem.* 283(32):21837–41.
- Groschner K, Rosker C, Lukas M. (2004) Role of TRP channels in oxidative stress. *Novartis Found Symp.* 258:222–30.
- Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland S, Drexler H, Schieffer B. (2003) Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res.* 92(11):e80–e86.
- Grover A, Hui J, Samson S. (2000) Catalase activity in coronary artery endothelium protects smooth muscle against peroxide damage. *Eur J Pharmacol.* 387(1):87–91.
- Grover A, Kwan C, Samson S. (2003a) Effects of peroxynitrite on sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoforms SERCA2b and SERCA3a. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285(6):C1537–43.
- Grover A, Samson S. (1988) Effect of superoxide radical on  $\text{Ca}^{2+}$  pumps of coronary artery. *Am J Physiol.* 255(3):C297–303.
- Grover A, Samson S. (1997) Peroxide resistance of ER  $\text{Ca}^{2+}$  pump in endothelium: Implications to coronary artery function. *Am J Physiol.* 273(4 Pt 1):C1250–C1258.

## BIBLIOGRAFÍA

- Grover A, Samson S, Fomin V. (1992) Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am J Physiol.* 263(2):H537–43.
- Grover A, Samson S, Fomin V, Werstiuk E. (1995) Effects of peroxide and superoxide on coronary artery: Ang II response and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump. *Am J Physiol.* 269(3 Pt 1):C546–53.
- Grover A, Samson S, Misquitta C. (1997) Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump isoform SERCA3 is more resistant than SERCA2b to peroxide. *Am J Physiol.* 273(2 Pt 1):C420–5.
- Grover A, Samson S, Robinson S, Kwan C. (2003b) Effects of peroxynitrite on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in pig coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284(2):C294–301.
- Grueter C, Abiria S, Dzhura I, Wu Y, Ham A, Mohler P, Anderson M, Colbran R. (2006) L-type Ca<sup>2+</sup> channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII. *Mol Cell.* 23(5):641–650.
- Grupe M, Myers G, Penner R, Fleig A. (2010) Activation of store-operated I(CRAC) by hydrogen peroxide. *Cell Calcium.* 48(1):1–9.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R. (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260(6):3440–3450.
- Guerrero-Hernandez A, Dagnino-Acosta A, Verkhatsky A. (2010) An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: release and leak channels have differential access to a concealed Ca<sup>2+</sup> pool. *Cell Calcium.* 48(2-3):143–149.
- Gutterman D, Miura H, Liu Y. (2005) Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(4):671–678.
- Guyton A, Hall J. (2011) *Tratado de Fisiología Médica.* WB Saunders. 12<sup>a</sup> edición.
- Guzik T, Sadowski J, Guzik B, Jopek A, Kapelak B, Przybylowski P, Wierzbicki K, Korbut R, Harrison D, Channon K. (2006) Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(2):333–339.
- Hara Y, Wakamori M, Ishii M, Maeno E, Nishida M, Yoshida T, Yamada H, Shimizu S, Mori E, Kudoh J, Shimizu N, Kurose H, Okada Y, Imoto K, Mori Y. (2002) LTRPC2 Ca<sup>2+</sup>-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell.* 9(1):163–173.
- Hare J, Stamler J. (2005) NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest.* 115(3):509–517.
- Hartmann, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning H, Sumser M, Abramowitz J, Blum R, Dietrich A, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Konnerth A. (2008) TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron.* 59(3):392–398, 2008.
- Hattori T, Kajikuri J, Katsuya H, Itoh T. (2003) Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on membrane potential of smooth muscle cells in rabbit mesenteric resistance artery. *Eur J Pharmacol.* 464(2):101–109.
- Hawkins BJ, Irrinki KM, Mallilankaraman K, Lien YC, Wang Y, Bhanumathy CD, Subbiah R, Ritchie MF, Soboloff J, Baba Y, Kurosaki T, Joseph SK, Gill DL, Madesh M. (2010) S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis. *J Cell Biol.* 190(3):391–405.
- Hein T, Qamirani E, Ren Y, Kuo L. (2009) C-reactive protein impairs coronary arteriolar dilation to prostacyclin synthase activation: role of peroxynitrite. *J Mol Cell Cardiol.* 47(2):196–202.

## BIBLIOGRAFÍA

- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 104(22):2673–2678.
- Hengartner M. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407(6805):770–776.
- Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. (2011) Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 51(5):993–999.
- Hernanz R, Briones AM, Saldaña M, Alonso MJ. (2014) New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 126(2):111–121.
- Hewavitharana T, Deng X, Soboloff J, Gill D. (2007) Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium*. 42(2):173–82.
- Heyndrickx G, Boettcher D, Vatner S. (1976) Effects of angiotensin, vasopressin, and methoxamine on cardiac function and blood flow distribution in conscious dogs. *Am J Physiol*. 231(5 Pt 1):1579–87.
- Hidalgo C, Donoso P. (2008) Crosstalk between calcium and redox signaling: From molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 10(7):1275–312.
- Hilgemann D, Nicoll D, Philipson K. (1991) Charge movement during Na<sup>+</sup> translocation by native and cloned cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Nature*. 352(6337):715–8.
- Hill-Eubanks D, Werner M, Heppner T, Nelson M. (2011) Calcium signaling in smooth muscle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3(9):a004549.
- Himpens B, Casteels R. (1987) Measurement by Quin2 of changes of the intracellular calcium concentration in strips of the rabbit ear artery and of the guinea-pig ileum. *Pflugers Arch*. 408(1):32–37.
- Hirai T, Tsuru H, Tanimitsu N, Takumida M, Watanabe H, Yajin K, Sasa M. (2000) Effect of hydrogen peroxide on guinea pig nasal mucosa vasculature. *Jpn J Pharmacol*. 84(4):470–473.
- Hisatsune C, Kuroda Y, Nakamura K, Inoue T, Nakamura T. (2004) Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 279(18):18887–18894.
- Hofmann T, Obukhov A, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. (1999) Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*. 397(6716):259–263.
- Holzer M, Gauster M, Pfeifer T, Wadsack C, Fauler G, Stiegler P, Koefeler H, Beubler E, Schuligoi R, Heinemann A, Marsche G. (2011) Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid Redox Signal*. 14(12):2337–2346.
- Hool L. (2000) Hypoxia increases the sensitivity of the L-type Ca<sup>2+</sup> current to beta-adrenergic receptor stimulation via a C2 region-containing protein kinase C isoform. *Circ Res*. 87(12):1164–1171.
- Hool L, Arthur P. (2002) Decreasing cellular hydrogen peroxide with catalase mimics the effects of hypoxia on the sensitivity of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel to beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes. *Circ Res*. 91(7):601–609.
- Hool L, Corry B. (2007) Redox control of calcium channels: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 9(4):409–435.

## BIBLIOGRAFÍA

- Hopson KP, Truelove J, Chun J, Wang Y, Waeber C. (2011) S1P activates store-operated calcium entry via receptor- and non-receptor-mediated pathways in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300(4):C919–26.
- Horowitz A, Menice C, Laporte R, Morgan K. (1996) Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 76(4):967–1003.
- Hoth M, Penner R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355(6358):353–356.
- House S, Ginnan R, Armstrong S, Singer H. (2007) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-delta isoform regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(6):C2276–C2287.
- House S, Potier M, Bisailon J, Singer H, Trebak M. (2008) The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch.* 456(5):769–785.
- Howarth FC, Qureshi M a, Hassan Z, Al Kury LT, Isaev D, Parekh K, Yammahi SRKD, Oz M, Adrian TE, Adeghate E. (2011) Changing pattern of gene expression is associated with ventricular myocyte dysfunction and altered mechanisms of Ca<sup>2+</sup> signalling in young type 2 Zucker diabetic fatty rat heart. *Exp Physiol.* 96(3):325–337.
- Hu Q, Corda S, Zweier JL, Capogrossi MC, Ziegelstein RC. (1998) Hydrogen Peroxide Induces Intracellular Calcium Oscillations in Human Aortic Endothelial Cells. *Circulation.* 97:268–275.
- Hu Q, Zheng G, Zweier J, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein R. (2000) NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 275(21):15749–15757.
- Huang P. (2009) eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends Endocrinol Metab.* 20(6):295–302.
- Hudasek K, Brown S, Fearon I. (2004) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates recombinant Ca<sup>2+</sup> channel alpha1C subunits but does not mediate their sensitivity to acute hypoxia. *Biochem Biophys Res Comm.* 318(1):135–141.
- Ignarro L, Harbison R, Wood K, Kadowitz P. (1986) Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 237(3):893–900.
- Iida Y, Katusic ZS. (2000) Mechanisms of Cerebral Arterial Relaxations to Hydrogen Peroxide Editorial Comment. *Stroke.* 31(9):2224–2230.
- Ilkun O, Boudina S. (2013) Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr Pharm Des.* 19(27):4806–4817.
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 49(11):1939-1945.
- Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, Ito Y, Mori Y. (2001) The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular alpha(1)-adrenoceptor-activated Ca(2+)-permeable cation channel. *Circ Res.* 88(3):325–332.

## BIBLIOGRAFÍA

- Irani K. (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival. *Circ Res.* 87(3):179–183.
- Ishihara Y, Sekine M, Hatano A, Shimamoto N. (2008) Sustained contraction and endothelial dysfunction induced by reactive oxygen species in porcine coronary artery. *Biol Pharm Bull.* 31(9):1667–1672.
- Iwamoto T, Pan Y, Wakabayashi S, Imagawa T, Yamanaka H, y Shigekawa M. (1996) Phosphorylation-dependent regulation of cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger via protein kinase C. *J Biol Chem.* 271(23):13609–13615.
- Jardin I, Lopez J, Salido G, Rosado J. (2008) Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem.* 283(37):25296–25304.
- Jensen P, Mulvany M, Aalkjaer C. (1992) Endogenous and exogenous agonist-induced changes in the coupling between [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and force in rat resistance arteries. *Pflugers Arch.* 420(5-6):536–543.
- Jeong E-M, Liu M, Sturdy M, Gao G, Varghese ST, Sovari A, Dudley SC. (2012) Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *J Mol Cell Cardiol.* 52(2):454–463.
- Jin L, Ying Z, Webb R. (2004) Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(4):H1495–H1500.
- Jin N, Rhoades R. (1997) Activation of tyrosine kinases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced contraction in pulmonary artery. *Am J Physiol.* 272(6):H2686–H2692.
- Jing Y, Yang J, Wang Y, Li H, Chen Y, Hu Q, Shi G, Tang X, y Yi J. (2006) Alteration of subcellular redox equilibrium and the consequent oxidative modification of nuclear factor kappaB are critical for anticancer cytotoxicity by emodin, a reactive oxygen species-producing agent. *Free Radic Biol Med.* 40(12):2183–2197.
- Jones S, O'donnell V, Wood J, Broughton J, Hughes E, Jones O. (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 271(4 Pt 2):H1626–H1634.
- Jung S, Muhle A, Schaefer M, Strotmann R, Schultz G, Plant T. (2003) Lanthanides potentiate TRPC5 currents by an action at extracellular sites close to the pore mouth. *J Biol Chem.* 278(6):3562–3571.
- Kadowaki T, Yamauchi T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 26(3):439–451.
- Kaneko M, Matsumoto Y, Hayashi H, Kobayashi A, Yamazaki N. (1994) Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. *Mol Cell Biochem.* 139(1):91–100.
- Kang Y, Mbonye U, DeLong C, Wada M, Smith W. (2007) Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res.* 46(2):108–125.
- Kapiotis S, Holzer G, Schaller G, Haumer M, Widhalm H, Weghuber D, Jilma B, Röggl G, Wolzt M, Widhalm K, Wagner O. (2006) A proinflammatory state is detectable in obese children and is accompanied by functional and morphological vascular changes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(11):2541–2546.
- Karpoff L, Vinet A, Schuster I, Oudot C, Goret L, Dauzat M, Obert P, Perez-Martin A. (2009) Abnormal vascular reactivity at rest and exercise in obese boys. *Eur J Clin Invest.* 39(2):94–102.

## BIBLIOGRAFÍA

- Katusic Z. (2001) Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281(3):H981–6.
- Katusic Z, Vanhoutte P. (1989) Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol.* 257(1 Pt 2):H33–7.
- Keisari Y, Braun L, Flescher E. (1983) The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology.* 165(1):78–89.
- Ketonen J, Mervaala E. (2008) Effects of dietary sodium on reactive oxygen species formation and endothelial dysfunction in low-density lipoprotein receptor-deficient mice on high-fat diet. *Heart Vessels.* 23(6):420–429.
- Ketonen J, Shi J, Martonen E, Mervaala E. (2010) Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet- induced obese C57Bl/6 mice. *Circ J.* 74(7):1479–1487.
- Kevil C, Oshima T, Alexander B, Coe L, Alexander J. (2000) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability: role of MAPK and occludin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 279(1):C21–30.
- Kim J, Saengsirisuwan V, Sloniger J, Teachey M, Henriksen E. (2006) Oxidant stress and skeletal muscle glucose transport: roles of insulin signaling and p38 MAPK. *Free Radic Biol Med.* 41(5):818–824.
- Kiviluoto S, Decuyper J, De Smedt H, Missiaen L, Parys J, Bultynck G. (2011) STIM1 as a key regulator for Ca<sup>2+</sup> homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet Muscle.* 1(1):1–16.
- Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph T, Rudolph V, Paust H, Schröder C, Benten D, Lau D, Szocs K, Furtmüller P, Heeringa P, Sydow K, Duchstein H, Ehmke H, Schumacher U, Meinertz T, Sperandio M, Baldus S. (2011) Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood.* 117(4):1350–1358.
- Knudson J, Dincer U, Bratz I, Sturek M, Dick G, Tune J. (2007) Mechanisms of coronary dysfunction in obesity and insulin resistance. *Microcirculation.* 14(4-5):317–338.
- Knudson J, Rogers P, Dincer U, Bratz I, Araiza A, Dick G, Tune J. (2006) Coronary vasomotor reactivity to endothelin-1 in the prediabetic metabolic syndrome. *Microcirculation.* 13(3):209–218.
- Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong M, Böhm M, O'Rourke B, Maack C. (2010) Elevated cytosolic Na<sup>+</sup> increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation.* 121(14):1606–1613.
- Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T. (2008) Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295(4):H1514–H1521.
- Kukreja R, Weaver A, Hess M. (1990) Sarcolemmal Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>-ATPase: Inactivation by neutrophil-derived free radicals and oxidants. *Am J Physiol.* 259(5 Pt 2):H1330–H1336.
- Kulmacz R. (2005) Regulation of cyclooxygenase catalysis by hydroperoxides. *Biochem Biophys Res Comm.* 338(1):25–33.
- Kumar B, Dreja K, Shah S, Cheong A, Xu S, Sukumar P, Naylor J, Forte A, Cipollaro M, McHugh D, Kingston P, Heagerty A, Munsch C, Bergdahl A, Hultgardh- Nilsson A, Gomez M, Porter K, Hellstrand P, Beech D. (2006) Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia. *Circ Res.* 98(4):557–563.

## BIBLIOGRAFÍA

- Kuo L, Thengchaisri N, Hein T. (2012) Regulation of Coronary Vasomotor Function by Reactive Oxygen Species. *Mol Med Ther.* 8(1):1–7.
- Kuroki M, Voest E, Amano S, Beerepoot L, Takashima S, Tolentino M, Kim R, Rohan R, Colby K, Yeo K, Adamis A. (1996) Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 98(7):1667–1675.
- Kuster GM, Lancel S, Zhang J, Communal C, Trucillo MP, Lim CC, Pfister O, Weinberg EO, Cohen R a, Liao R, Deborah A, Colucci WS. (2010) Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med.* 48(9):1182–1187.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison D, Dikalov S. (2003) Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 278(25):22546–22554.
- Kvietys PR, Granger DN. (2012) Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med.* 52(3):556–592.
- Kwan H, Huang Y, Yao X. (2004) Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(8):2625–2630.
- Lacampagne A, Duittoz A, Bolanos P, Peineau N, Argibay J. (1995) Effect of sulfhydryl oxidation on ionic and gating currents associated with L-type calcium channels in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 30(5):799–806.
- Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. (2012) The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res.* 95(2):194–204.
- Lam C, Peterson T, Richardson D, Croatt A, DÚscio L, Nath K, ZS K. (2006) Increased blood flow causes coordinated upregulation of arterial eNOS and biosynthesis of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290(2):H786–H793.
- Lancel S, Qin F, Lennon S, Zhang J, Tong X, Mazzini M, Kang Y, Siwik D, Cohen R, Colucci W. (2010) Oxidative posttranslational modifications mediate decreased SERCA activity and myocyte dysfunction in Galphaq-overexpressing mice. *Circ Res.* 107(2):228–232.
- Landmesser U, Dikalov S, Price S, McCann L, Fukai T, Holland S, Mitch W, Harrison D. (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 111(8):1201–1209.
- Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. (2012) Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.* 110(10):1364–1390.
- Laursen J, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman B, Harrison D. (1997) Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 95(3):588–593.
- Lee D, Webb R, Jin L. (2004) Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension.* 44(6):796–799.
- Lee MY, Griendling KK. (2008) Redox signaling, vascular function, and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 10(6):1045–1059.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lehoux S, Lemarie C, Esposito B, Lijnen H, Tedgui A. (2004) Pressure- induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation*. 109(8):1041–1047.
- Lei K, Townsend D, Tew K. (2008) Protein cysteine sulfinic acid reductase (sulfiredoxin) as a regulator of cell proliferation and drug response. *Oncogene*. 27(36):4877–4887.
- Li A, Ito H, Rovira I, Kim K, Takeda K, Yu Z, Ferrans V, Finkel T. (1999) A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res*. 85(4):304–310.
- Li H, Förstermann U. (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol*. 190(3):244–254.
- Li J, Shah A. (2003) ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: Potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 14(8 Suppl 3):S221–S226.
- Li J, Shah A. (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287(5):R1014 – R1030.
- Li J, Su J, Li W, Liu W, Altura B, Altura B. (2003) Peroxynitrite induces apoptosis in canine cerebral vascular muscle cells: possible relation to neurodegenerative diseases and strokes. *Neurosci Lett*. 350(3):173–177.
- Li W, Miller FJ, Zhang H, Spitz D, Oberley L, Weintraub N. (2001) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced O<sub>2</sub> production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem*. 276(31):29251–29256.
- Li Z, Liu L, Deng Y, Ji W, Du W, Xu P, Chen L, Xu T. (2011) Graded activation of CRAC channel by binding of different numbers of STIM1 to Orai1 subunits. *Cell Res*. 21(2):305–315.
- Libby P, Aikawa M, Jain M. (2006) Vascular endothelium and atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*. 176 Pt 2:285–306.
- Lim J, Choi H, Park Y, Nam H, Woo H, Kwon K, Kim Y, Rhee S, Kim K, Chae H. (2008) Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J Biol Chem*. 283(43):28873–28880.
- Lin M, Yang X, Cao Y, Sham J. (2007) Hydrogen peroxide-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292(6):L1598–L1608.
- Liou J, Kim M, Heo W, Jones J, Myers J, Ferrell JJ, Meyer T. (2005) STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol*. 15(13):1235–1241.
- Liu C, Wong S, Leung F, Tian X, Lau C, Lu L, Yao X, Chen Z, Yao T, Huang Y. (2010) Prostanoid TP receptor-mediated impairment of cyclic AMP-dependent vasorelaxation is reversed by phosphodiesterase inhibitors. *Eur J Pharmacol*. 632(1-3):45–51.
- Liu Y, Bubolz A, Mendoza S, Zhang D, Gutterman D. (2011) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. *Circ Res*. 108(5):566–573.
- Loomis E, Sullivan J, Osmond D, Pollock D, Pollock J. (2005) Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 315(3):1058–1064.
- Los M, Dröge W, Stricker K, Baeuerle P, Schulze-Osthoff K. (1995) Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol*. 25(1):159–165.

## BIBLIOGRAFÍA

- Lounsbury K, Hu Q, Ziegelstein R. (2000) Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med.* 28(9):1362–1369.
- Lucchesi P, Belmadani S, Matrougui K. (2005) Hydrogen peroxide acts as both vasodilator and vasoconstrictor in the control of perfused mouse mesenteric resistance arteries. *J Hypertens.* 23(3):571–579.
- Luo X, Hojavev B, Jiang N, Wang Z, Tandan S, Rakalin A, Rothermel B, Gillette T, Hill J. (2012) STIM1-dependent store-operated  $Ca^{2+}$  entry is required for pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 52(1):136–147.
- MacMillan-Crow L, Crow J, Thompson J. (1998) Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry.* 37(6):1613–1622.
- Madamanchi N, Li S, Patterson C, Runge M. (2001) Thrombin regulates vascular smooth muscle cell growth and heat shock proteins via the JAK-STAT pathway. *J Biol Chem.* 276(22):18915–18924.
- Madamanchi NR, Runge MS. (2013) Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med.* 61C:473–501.
- Maier L, Bers D. (2007) Role of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res.* 73(4):631–640.
- Majzunova M, Dovinova I, Barancik M, Chan JYH. (2013) Redox signaling in pathophysiology of hypertension. *J Biomed Sci.* 20(1):69.
- Marengo J, Hidalgo C, Bull R. (1998) Sulfhydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys J.* 74(3):1263–1277.
- Maroto R, Raso A, Wood T, Kurosky A, Martinac B, Hamill O. (2005) TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nature Cell Biology.* 7(2):179–185.
- Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Álvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón J V., García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. (2012) Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 18(1):51–65.
- Masset M, Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G, Koller A. (2002) Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(6):H2282–H2287.
- Mather K, Lteif A, Steinberg H, Baron A. (2004) Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. *Diabetes.* 53(8):2060–2066.
- Mather K, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg H, Baron A. (2002) Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 51(12):3517–3523.
- Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, Urakami-Harasawa L, Mukai Y, Hirakawa Y, Akaike T, Takeshita A. (2003) Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(7):1224–1230.

## BIBLIOGRAFÍA

- Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 106(12):1521–1530.
- Maulik N, Das D. (2002) Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med.* 33(8):1047–1060.
- McAdam B, Catella-Lawson F, Mardini I, Kapoor S, Lawson J, FitzGerald G. (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(1):272–277.
- Meng T, Fukada T, Tonks N. (2002) Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell.* 9(2):387–399.
- Mensah G. (2007) Healthy endothelium: the scientific basis for cardiovascular health promotion and chronic disease prevention. *Vascul Pharmacol.* 46(5):310–314.
- Mignen O, Thompson J, Shuttleworth T. (2007) STIM1 regulates  $Ca^{2+}$  entry via arachidonate-regulated  $Ca^{2+}$ -selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *J Physiol.* 579(Pt3):703–715.
- Mignen O, Thompson J, Shuttleworth T. (2008) Both Orai1 and Orai3 are essential components of the arachidonate-regulated  $Ca^{2+}$ -selective (ARC) channels. *J Physiol.* 586(Pt 1):185–195.
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. (1989) Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.* 340(6230):230–233.
- Misquitta C, Mack D, Grover A. (1999) Sarco/ endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  (SERCA)-pumps: Link to heart beats and calcium waves. *Cell Calcium.* 25(4):277–290.
- Mita M, Ito K, Taira K, Nakagawa J, Walsh M, Shoji M. (2010) Attenuation of store-operated  $Ca^{2+}$  entry and enhanced expression of TRPC channels in caudal artery smooth muscle from Type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 37(7):670–678.
- Mitchell J, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington L. (2008) Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.* 93(1):141–147.
- Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman D. (2003) Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res.* 92(2):31–40.
- Miura H, Liu Y, Gutterman D. (1999) Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels. *Circulation.* 99(24):3132–3138.
- Moens A, Kass D. (2006) Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(11):2439–2444.
- Moens A, Takimoto E, Tocchetti C, Chakir K, Bedja D, Cormaci G, Ketner E, Majmudar M, Gabrielson K, Halushka M, Mitchell J, Biswal S, Channon K, Wolin M, Alp N, Paolocci N, Champion H, Kass D. (2008) Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of reopling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. *Circulation.* 117(20):2626–2636.

## BIBLIOGRAFÍA

- Molavi B, Mehta J. (2004) Oxidative stress in cardiovascular disease: Molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr Opin Pharmacol.* 19(5):488–493.
- Montell C. (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005(272):re3.
- Montezano AC, Touyz RM. (2012) Reactive oxygen species and endothelial function-role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 110(1):87–94.
- Montezano AC, Touyz RM. (2014) Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal.* 20(1):164–182.
- Morgado M, Cairrão E, Santos-Silva A, Verde I. (2012) Cyclic nucleotide- dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci.* 69(2):247–266.
- Morris T, Sulakhe P. (1997) Sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ - pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med.* 22(1-2):37–47.
- Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams W, Requena J, Berlett B, Stadtman E. (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(23):12920–12925.
- Muellenbach E, Diehl C, Teachey M, Lindborg K, Hasselwander O, Matuschek M, Henriksen E. (2009) Metabolic interactions of the AGE inhibitor pyridoxamine and the antioxidant alpha-lipoic acid following 22 weeks of treatment in obese Zucker rats. *Life Sci.* 84(15-16):563–568.
- Muik M, Fahrner M, Derler I, Schindl R, Bergsmann J, Frischauf I, Groschner K, Romanin C. (2009) A cytosolic Homomerization and a modulatory domain within STIM1 C-terminus determine coupling to ORAI1 channels. *J Biol Chem.* 284(13):842196.
- Mulvany MJ, Halpern W. (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 41(1):19–26.
- Murphy A. (1976) Sulfhydryl group modification of sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochemistry.* 15:4492–4496.
- Murphy T, Spurrell B, Hill M. (2001) Tyrosine phosphorylation following alterations in arteriolar intraluminal pressure and wall tension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281(3):H1047–H1056.
- Muslin A. (2008) MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond).* 115(7):203–218.
- Naderali E, Brown M, Pickavance L, Wilding J, Doyle P, Williams G. (2001) Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin Sci (Lond).* 101(5):499–506.
- Nakahata N. (2008) Thromboxane  $A_2$ : physiology/ pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 118(1):18–35.
- Neo B, Kandhi S, Ahmad M, Wolin M. (2010) Redox regulation of guanylate cyclase and protein kinase G in vascular responses to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 174(3):259–264.
- Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol.* 73:26–33.

## BIBLIOGRAFÍA

- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T. (2005) Gating of TRP channels: a voltage connection. *J Physiol.* 567(Pt 1):35–44.
- Nogueira C, Zeni G, Rocha J. (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev.* 104(12):6255–6285.
- Nordberg J, Arnér E. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31(11):1287–1312.
- Nunes P, Demaurex N. (2014) Redox regulation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Antioxid Redox Signal.* 21(6):915–932.
- Oberwinkler J, Lis A, Giehl K, Flockerzi V, Philipp S. (2005) Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *J Biol Chem.* 280(23):22540–22548.
- Oeckler R, Arcuino E, Ahmad M, Olson S, Wolin M. (2005) Cytosolic NADH redox and thiol oxidation regulate pulmonary arterial force through ERK MAP kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288(6):L1017–L1025.
- Oeckler R, Kaminski P, Wolin M. (2003) Stretch enhances contraction of bovine coronary arteries via an NAD(P)H oxidase-mediated activation of the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase cascade. *Circ Res.* 92(1):23–31.
- Oltman C, Richou L, Davidson E, Coppey L, Lund D, Yorek M. (2006) Progression of coronary and mesenteric vascular dysfunction in Zucker obese and Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291(4):H1780–H1787.
- Ong H, Cheng K, Liu X, Bandyopadhyay B, Paria B, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, Srikanth S, Singh B, Gill D, Ambudkar I. (2007) Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem.* 282(12):9105–9116.
- Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. (2003) Regulation of cell death: the calcium- apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7):552–565.
- Palmer R, Ferrige A, Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327(6122):524–526.
- Paravicini TM, Touyz RM. (2006) Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 71(2):247–258.
- Paravicini TM, Touyz RM. (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 31 Suppl 2:S170–S180.
- Parekh A. (2006) On the activation mechanism of store-operated calcium channels. *Pflugers Arch.* 453(3):303–311.
- Parekh A, Penner R. (1995) Activation of store-operated calcium influx at resting  $\text{InsP}_3$  levels by sensitization of the  $\text{InsP}_3$  receptor in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol.* 489(Pt 2):377–382.
- Parekh A, Penner R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 77(4):901–930.
- Parekh A, Putney JJ. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85(2):757–810.

## BIBLIOGRAFÍA

- Parikh N, Keyes M, Larson M, Pou K, Hamburg N, Vita J, O'Donnell C, Vasan R, Mitchell G, Hoffmann U, Fox C, Benjamin E. (2009) Visceral and subcutaneous adiposity and brachial artery vasodilator function. *Obesity (Silver Spring)*. 17(11):2054–2059.
- Park C, Hoover P, Mullins F, Bachhawat P, Covington E, Raunser S, Walz T, Garcia K, Dolmetsch R, Lewis R. (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell*. 136(5):876–890.
- Park C, Shcheglovitov A, Dolmetsch R. (2010) The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*. 330(6000):101–105.
- Payne G, Borbouse L, Kumar S, Neeb Z, Alloosh M, Sturek M, Tune J. (2010) Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a protein kinase C-beta pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(9):1711–1717.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, Cobb M. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 22(2):153–183.
- Pedersen S, Owsianik G, Nilius B. (2005) TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 38(3-4):233–252.
- Peers C, Scragg J, Boyle J, Fearon I, Taylor S, Green K, Webster N, Ramsden M, Pearson H. (2005) A central role for ROS in the functional remodelling of L-type  $Ca^{2+}$  channels by hypoxia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 360(1464):2247–2254.
- Pelaez N, Osterhaus S, Mak A, Zhao Y, Davis H, Packer C. (2000a) MAPK and PKC activity are not required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced arterial muscle contraction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279(3):1194–1200.
- Pelaez NJ, Braun TR, Paul RJ, Meiss RA, Packer CS. (2000b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates  $Ca^{2+}$ - and MLC20 phosphorylation-independent contraction in intact and permeabilized vascular muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 279(3):1185–1193.
- Perez J, Sanderson M. (2005) The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. *J Gen Physiol*. 125(6):535–553.
- Pérez N, Gao W, Marbán E. (1998) Novel myofilament  $Ca^{2+}$ -sensitizing property of xanthine oxidase inhibitors. *Circ Res*. 83(4):423–430.
- Perez-Vizcaíno F, Cogolludo A, Moreno L. (2010) Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol*. 174(3):212–220.
- Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli P. (2001) Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes*. 50(1):159–165.
- Pessah I, Kim K, Feng W. (2002) Redox sensing properties of the ryanodine receptor complex. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 7:a72–9.
- Peters K, Unger R, Brunner J, Kirkpatrick C. (2003) Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res*. 60(1):49–57.
- Phillips S, Sylvester F, Frisbee J. (2005) Oxidant stress and constrictor reactivity impair cerebral artery dilation in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288(2):R522–R530.

## BIBLIOGRAFÍA

- Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter B, Focardi M, Chilian W, Zhang C. (2006) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res.* 99(1):69–77.
- Plant T, Schaefer M. (2005) Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 371(4):266–276.
- Pober J, Sessa W. (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 7(10):803–815.
- Poitras M, Bernier S, Servant M, Richard D, Boulay G, Guillemette G. (1993) The high affinity state of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is a functional state. *J Biol Chem.* 268(32):24078–24082.
- Pörsti I, Hecker M, Bassenge E, Busse R. (1993) Dual action of angiotensin II on coronary resistance in the isolated perfused rabbit heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 348(6):650–658.
- Porter Moore C, Zhang J, Hamilton S. (1999) A role for cysteine 3635 of RYR1 in redox modulation and calmodulin binding. *J Biol Chem.* 274(52):36831–36834.
- Poteser M, Graziani A, Rosker C, Eder P, Derler I, Kahr H, Zhu M, Romanin C, Groschner K. (2006) TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *J Biol Chem.* 281(19):13588–13595.
- Poteser M, Romanin C, Schreiber W, Mayer B, Groschner K. (2001) S-nitrosation controls gating and conductance of the  $\alpha$ 1 subunit of class C L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J Biol Chem.* 276(18):14797–14803.
- Potier M, Gonzalez J, Motiani R, Abdullaev I, Bisailon J, Singer H, Trebak M. (2009) Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J.* 23(8):2425–2437.
- Pourmahram G, Snetkov V, Shaifta Y, Drndarski S, Knock G, Aaronson P, Ward J. (2008) Constriction of pulmonary artery by peroxide: role of  $\text{Ca}^{2+}$  release and PKC. *Free Radic Biol Med.* 45:1468–1476.
- Prakash R, Mintz J, Stepp D. (2006) Impact of obesity on coronary microvascular function in the Zucker rat. *Microcirculation.* 13(5):389–396.
- Price D, Vita J, Keane JJ. (2000) Redox control of vascular nitric oxide bioavailability. *Antioxid Redox Signal.* 2(4):919–935.
- Prieto D, Contreras C, Sánchez A. (2014) Endothelial Dysfunction, Obesity and Insulin Resistance. *Curr Vasc Pharmacol.* 12(3):412–426.
- Prieto D, Kaminski P, Bagi Z, Ahmad M, Wolin M. (2010) Hypoxic relaxation of penile arteries: involvement of endothelial nitric oxide and modulation by reactive oxygen species. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299(3):H915–H924.
- Pryszazhna O, Rudyk O, Eaton P. (2012) Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med.* 18(2):286–290.
- Pung YF, Rocic P, Murphy MP, Smith R a J, Hafemeister J, Ohanyan V, Guarini G, Yin L, Chilian WM. (2012) Resolution of mitochondrial oxidative stress rescues coronary collateral growth in Zucker obese fatty rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(2):325–334.

## BIBLIOGRAFÍA

- Puri N, Zhang F, Monu SR, Sodhi K, Bellner L, Lamon BD, Zhang Y, Abraham NG, Nasjletti A. (2013) Antioxidants condition pleiotropic vascular responses to exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: role of modulation of vascular TP receptors and the heme oxygenase system. *Antioxid Redox Signal*. 18(5):471–480.
- Putney JJ. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 7(1):1–12.
- Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein T. (2005) C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(5):995–1001.
- Qi M, Elion E. (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci*. 118(Pt 16):3569–3572.
- Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. (2002) Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 33(11):1451–1464.
- Ramachandran A, Levonen A, Brookes P, Ceaser E, Shiva S, Barone M, Darley-Usmar V. (2002) Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 33(11):1465–1474.
- Ramsey I, Delling M, Clapham D. (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*. 68:619–647.
- Rask-Madsen C, Kahn CR. (2012) Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 32(9):2052-9.
- Ray P, Huang B, Tsuji Y. (2012) Reactive oxygen species homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 24(5):981–990.
- Reddy ST, Wadleigh DJ, Herschman HR. (2000) Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene in activated mast cells. *J Biol Chem*. 275(5):3107–3113.
- Redondo P, Salido G, Pariente J, Rosado J. (2004a) Dual effect of hydrogen peroxide on store-mediated calcium entry in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 67(6):1065–1076.
- Redondo PC, Salido GM, Rosado JA, Pariente JA. (2004b) Effect of hydrogen peroxide on Ca<sup>2+</sup> mobilisation in human platelets through sulphhydryl oxidation dependent and independent mechanisms. *Biochem Pharmacol*. 67(3):491–502.
- Reeves J, Bailey C, Hale C. (1986) Redox modification of sodium–calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem*. 261(11):4948–4955.
- Ritchie M, Samakai E, Soboloff J. (2012) STIM1 is required for attenuation of PMCA-mediated Ca<sup>2+</sup> clearance during T-cell activation. *EMBO J*. 31(5):1123–1133.
- Rizzuto R, Pozzan T. (2006) Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*. 86(1):369–408.
- Roderick H, Cook S. (2008) Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*. 8(5):361–375.
- Rodríguez-Martínez MA, García-Cohen EC, Baena AB, González R, Salaíces M, Marín J. (1998) Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol*. 125(6):1329–1335.

## BIBLIOGRAFÍA

- Roe N, Ren J. (2012) Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 57(5-6):168–172.
- Rogers P, Chilian W, Bratz I, Bryan RJ, Dick G. (2007) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates redox- and 4-aminopyridine-sensitive K<sub>v</sub> channels in coronary vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(3):H1404–H1411.
- Romero J, Reckelhoff J. (1999) Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension.* 34(4 Pt 2):943–949.
- Roos J, DiGregorio P, Yeromin A, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak J, Wagner S, Cahalan M, Velicelebi G, Stauderman K. (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol.* 169(3):435–445.
- Rosado J, Redondo P, Salido G, Gomez-Arteta E, Sage S, Pariente J. (2004) Hydrogen peroxide generation induces pp60src activation in human platelets: evidence for the involvement of this pathway in store-mediated calcium entry. *J Biol Chem.* 279(3):1665–1675.
- Rosker C, Graziani A, Lukas M, Eder P, Zhu M, Romanin C, Groschner K. (2004) Ca<sup>2+</sup> signaling by TRPC3 involves Na<sup>+</sup> entry and local coupling to the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem.* 279(14):13696–13704.
- Rubanyi G, Lorenz R, Vanhoutte P. (1985) Bioassay of endothelium- derived relaxing factor(s): inactivation by catecholamines. *Am J Physiol.* 249(1 Pt 2):H95–101.
- Sag C, Köhler A, Anderson M, Backs J, Maier L. (2011) CaMKII-dependent SR Ca<sup>2+</sup> leak contributes to doxorubicin- induced impaired Ca<sup>2+</sup> handling in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 51(5):749–759.
- Saito Y, Berk B. (2001) Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol.* 33(1):3–7.
- Saitoh S, Kiyooka T, Rocic P, Rogers P, Zhang C, Swafford A, Dick GM, Viswanathan C, Park Y, Chilian WM. (2007) Redox-dependent coronary metabolic dilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293(6):H3720–H3725.
- Saitoh S, Zhang C, Tune J, Potter B, Kiyooka T, Rogers P, Knudson J, Dick G, Swafford A, Chilian W. (2006) Hydrogen peroxide: a feed-forward dilator that couples myocardial metabolism to coronary blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(12):2614–2621.
- Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, Wang Y, Seto M, Sasaki Y, Takuwa Y. (2003) Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res.* 93(6):548–556.
- Sánchez A, Contreras C, Martínez P, Villalba N, Benedito S, García-Sacristán A, Salaíces M, Hernández M, Prieto D. (2010) Enhanced cyclooxygenase 2-mediated vasorelaxation in coronary arteries from insulin-resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis.* 213(2):392–399.
- Sandow S, Hill C. (2000) Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses. *Circ Res.* 86(3):341–346.
- Santacruz-Tolosa L, Ottolia M, Nicoll D, Philipson K. (2000) Functional analysis of a disulfide bond in the cardiac Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Biol Chem.* 275(1):182–188.

## BIBLIOGRAFÍA

- Santo-Domingo J, Demaurex N. (2010) Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1797(6-7):907–912.
- Sato A, Sakuma I, Gutterman D. (2003) Mechanism of dilation to reactive oxygen species in human coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(6):2345–2354.
- Satoh K, Godo S, Saito H, Enkhjargal B, Shimokawa H. (2014) Dual roles of vascular-derived reactive oxygen species-with a special reference to hydrogen peroxide and cyclophilin A. *J Mol Cell Cardiol.* 73:50–56.
- Savoia C, Sada L, Zezza L, Pucci L, Lauri FM, Befani A, Alonzo A, Volpe M. (2011) Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *Int J Hypertens.* 2011:281240.
- Schafer F, Buettner G. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30(11):1191–1212.
- Schaller M, Borgman C, Cobb B, Vines R, Reynolds A, Parsons J. (1992) pp125fak a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(11):5192–5196.
- Schleifer H, Doleschal B, Lichtenegger M, Oppenrieder R, Derler I, Frischauf I, Glasnov TN, Kappe CO, Romanin C, Groschner K. (2012) Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry pathways. *Br J Pharmacol.*
- Schwartz S, Campbell G, Campbell J. (1986) Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res.* 58(4):427–444.
- Scragg J, Dallas M, Wilkinson J, Varadi G, Peers C. (2008) Carbon monoxide inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> channels via redox modulation of key cysteine residues by mitochondrial reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 283(36):24412–24419.
- Sellke F, Simons M. (1999) Angiogenesis in cardiovascular disease: current status and therapeutic potential. *Drugs.* 58(3):391–396.
- Serpillon S, Floyd B, Gupte R, George S, Kozicky M, Neito V, Recchia F, Stanley W, Wolin M, Gupte S. (2009) Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297(1):H153–156.
- Serrander L, Cartier L, Bedard K, Banfi B, Lardy B, Plastre O, Sienkiewicz A, Fórró L, Schlegel W, Krause K-H. (2007) NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J.* 406(1):105–114.
- Shao D, Oka S, Brady CD, Haendeler J, Eaton P, Sadoshima J. (2012) Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* 52(3):550–558.
- Shattock M, Matsuura H. (1993) Measurement of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell voltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxidant stress. *Circ Res.* 72(1):91–101.
- Shen D, Dalton T, Nebert D, Shertzer H. (2005) Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem.* 280(27):25305–12.

## BIBLIOGRAFÍA

- Shen X, Zheng S, Metreveli N, Epstein P. (2006) Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 55(3):798–805.
- Shi Y, Vanhoutte PM. (2008) Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 154(3):639–651.
- Shimokawa H. (2010) Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Arch*. 459(6):915–922.
- Shimokawa H, Morikawa K. (2005) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol*. 39(5):725–732.
- Shuttleworth T. (2009) Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins. *Cell Calcium*. 45(6):602–610.
- Silver A, Beske S, Christou D, Donato A, Moreau K, Eskurza I, Gates P, Seals D. (2007) Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation*. 115(5):627–637.
- Smyth J, DeHaven W, Jones B, Mercer J, Trebak M, Vazquez G, Putney JJ. (2006) Emerging perspectives in store-operated  $Ca^{2+}$  entry: Roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta*. 1763(11):1147–1160.
- Snetkov V, Aaronson P, Ward J, Knock G, Robertson T. (2003) Capacitative calcium entry as a pulmonary specific vasoconstrictor mechanism in small muscular arteries of the rat. *Br J Pharmacol*. 140(1):97–106.
- Sobey C, Heistad D, Faraci F. (1997) Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate  $K^+$  channels. *Stroke*. 28(11):2290–4.
- Soboloff J, Spassova M, Xu W, He L, Cuesta N, Gill DL. (2005) Role of endogenous TRPC6 channels in  $Ca^{2+}$  signal generation in A7r5 smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 280(48):39786–39794.
- Sohn H, Raff U, Hoffmann A, Gloe T, Heermeier K, Galle J, Pohl U. (2000) Differential role of angiotensin II receptor subtypes on endothelial superoxide formation. *Br J Pharmacol*. 131(4):667–672.
- Somlyo AP, Somlyo AV. (2003)  $Ca^{2+}$  Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev*. 83(4):1325–1358.
- Son Y, Cheong Y, Kim N, Chung H, Kang D, Pae H. (2011) Mitogen- activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?. *J Signal Transduct*. 2011:792639.
- Song MY, Makino A, Yuan JX. (2011) Role of reactive oxygen species and redox in regulating the function of transient receptor potential channels. *Antioxid Redox Signal*. 15(6):1549–1565.
- Song Y, Cho H, Ryu S, Yoon J, Park S, Noh C, Lee S, Ho W. (2010) L-type  $Ca^{2+}$  channel facilitation mediated by  $H_2O_2$ -induced activation of CaMKII in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 48(4):773–780.
- Song Y, Shryock J, Wagner S, Maier L, Belardinelli L. (2006) Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide- induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*. 318(1):214–222.
- Sotníková R. (1998) Investigation of the mechanisms underlying  $H_2O_2$ -evoked contraction in the isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*. 31(1):115–119.

## BIBLIOGRAFÍA

- Soto M, Gonzalez C, Lissi E, Vergara C, Latorre R. (2002)  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel inhibition by reactive oxygen species. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(3):C461–471.
- Steepe D, Belin De Chantemele E. (2007) Structural remodeling in the limb circulation: impact of obesity and diabetes. *Microcirculation.* 14(4-5):311–316.
- Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J, Baron AD. (2000) Free fatty acid elevation impairs insulin mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes.*49(7):1231-8.
- Sturm W, Sandhofer A, Engl J, Laimer M, Molnar C, Kaser S, Weiss H, Tilg H, Ebenbichler C, Patsch J. (2009) Influence of visceral obesity and liver fat on vascular structure and function in obese subjects. *Obesity (Silver Spring).* 17(9):1783–1788.
- Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani M, Clark K, Goldschmidt-Clermont P, Flavahan N. (2001) Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circ Res.* 89(1):39–46.
- Subramanian R, MacLeod K. (2003) Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol.* 477(2):143–152.
- Sun J, Xin C, Eu J, Stamler J, Meissner G. (2001) Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(20):11158–11162.
- Sun L, Yau HY, Lau OC, Huang Y, Yao X. (2011) Effect of hydrogen peroxide and superoxide anions on cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ : Comparison of endothelial cells from large-sized and small-sized arteries. *PLoS ONE.* 6(9):e25432.
- Sundaresan M, Yu Z, Ferrans V, Irani K, Finkel T. (1995) Requirement for generation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science.* 270(5234):296–299.
- Suvorava T, Lauer N, Kumpf S, Jacob R, Meyer W, Kojda G. (2005) Endogenous vascular hydrogen peroxide regulates arteriolar tension in vivo. *Circulation.* 112(16):2487–2495.
- Suzuki Y, Ford G. (1992) Superoxide stimulates  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 262(1 Pt 2):H114–6.
- Suzuki Y, Yoshimaru T, Inoue T, Ra C. (2009) Discrete generations of intracellular hydrogen peroxide and superoxide in antigen-stimulated mast cells: reciprocal regulation of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity. *Mol Immunol.* 46(11-12):2200–2209.
- Sweeney M, Yu Y, Platoshyn O, Zhang S, McDaniel S, Yuan J. (2002) Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol* 283: L144– L155, 2002. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283(1):L144–155.
- Szasz T, Thakali K, Fink G, Watts S. (2007) A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 232(1):27–37.
- Szerafin T, Erdei N, Fülöp T, Pasztor EET, Edes I, Koller A, Bagi Z, Édes I, Koller A, Bagi Z. (2006) Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circ Res.* 99(5):e12–e17.
- Tabet F, Savoia C, Schiffrin E, Touyz R. (2004) Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 44(2):200–208.

## BIBLIOGRAFÍA

- Takac I, Schröder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth J, Shah A, Morel F, Brandes R. (2011) The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem.* 286(15):13304–13313.
- Tan W, Colombini M. (2007) VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta.* 1768(10):2510–2515.
- Tan X, Essengue S, Talreja J, Reese J, Stechschulte DJ, Dileepan KN (2007). Histamine directly and synergistically with lipopolysaccharide stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> production in human coronary artery endothelial cells. *J Immunol.* 179(11):7899-7906.
- Tanaka Y, Koike K, Toro L. (2004) MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res.* 40(4-5):125–153.
- Tang X, Garcia M, Heinemann S, Hoshi T. (2004) Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing. *Nat Struct Mol Biol.* 11(2):171–178.
- Taniyama Y, Griendling K. (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 42(6):1075–1081.
- Tauber A, Borregaard N, Simons E, Wright J. (1983) Chronic granulomatous disease: A syndrome of phagocyte oxidase deficiencies. *Medicine (Baltimore).* 62(5):286–309.
- Teramoto N. (2006) Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. *J Physiol.* 572(Pt 3):617–624.
- Tessier-Lavigne M, Goodman C. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274(5290):1123–1133.
- Thakali K, Davenport L, Fink G, Watts S. (2007) Cyclooxygenase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase MAPK, Rho kinase, and Src mediate hydrogen peroxide-induced contraction of rat thoracic aorta and vena cava. *J Pharmacol Exp Ther.* 320(1):236–243.
- Thakali K, Davenport L, Fink GD, Watts SW. (2006) Pleiotropic effects of hydrogen peroxide in arteries and veins from normotensive and hypertensive rats. *Hypertension.* 47(3):482–487.
- Thakali K, Demel SL, Fink GD, Watts SW. (2005) Endothelin-1-induced contraction in veins is independent of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289(3):H1115–11122.
- Thengchaisri N, Kuo L. (2003) Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(6):H2255–2263.
- Thomas S, Witting P, Drummond G. (2008) Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 10(10):1713–1765.
- Thompson J, Mignen O, Shuttleworth T. (2010) The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid. *Channels (Austin).* 4(5):398–410.
- Thorneloe K, Nelson M. (2005) Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol.* 83(3):215–242.

## BIBLIOGRAFÍA

- Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang Y-X, Lee HK, Ng CF, Chen ZY, Yao X, Au CL, Lau CW, Vanhoutte PM, Cooke JP, Huang Y. (2012) Oxidative Stress-Dependent Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin f(2 $\alpha$ ) Impairs Endothelial Function in Renovascular Hypertensive Rats. *Antioxid Redox Signal*. 16(4):363–373.
- Tiwari S, Zhang Y, Heller J, Abernethy D, Soldatov N. (2006) Atherosclerosis-related molecular alteration of the human CaV1.2 calcium channel alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(45):17024–17029.
- Tong X, Evangelista A, Cohen R. (2010) Targeting the redox regulation of SERCA in vascular physiology and disease. *Curr Opin Pharmacol*. 10(2):133–138.
- Toniolo A, Buccellati C, Pinna C, Gaion RM, Sala A, Bolego C. (2013) Cyclooxygenase-1 and Prostacyclin Production by Endothelial Cells in the Presence of Mild Oxidative Stress. *PLoS ONE*. 8(2):3–8.
- Tornquist K, Vainio P, Titievsky A, Dugue B, Tuominen R. (1999) Redox modulation of intracellular free calcium concentration in thyroid FRTL-5 cells: evidence for an enhanced extrusion of calcium. *Biochem J*. 339(Pt 3):621–628.
- Touyz R. (2005) Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: Implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 7(9-10):1302–1314.
- Touyz R, Briones AM. (2011) Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens Res*. 34(1):5-14
- Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. (2001) NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv*. 11(1):27-35.
- Townsend D. (2007) S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol Interv*. 7(6):313–324.
- Trebak M. (2012) STIM/Orai signalling complexes in vascular smooth muscle. *J Physiol*. 590(Pt 17):4201–4208.
- Trebak M, Ginnan R, Singer H, Jourd D. (2010) Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid Redox Signal*. 12(5):657–674.
- Trebak M, Lemonnier L, Smyth J, Vazquez G, Putney JJ. (2007) Phospholipase C-coupled receptors and activation of TRPC channels. 593–614, 2007. *Handb Exp Pharmacol*. (179):593–614.
- Trebak M, Vazquez G, Bird G, Putney JJ. (2003) The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium*. 33(5-6):451–461.
- Trepakova E, Cohen R, Bolotina V. (1999) Nitric oxide inhibits capacitative cation influx in human platelets by promoting sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase-dependent refilling of Ca<sup>2+</sup> stores. *Circ Res*. 84(2):201–209.
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista D, Nassini R, Campi B, Imamachi N, Andre E, Patacchini R, Cottrell G, Gatti R, Basbaum A, Bunnett N, Julius D, Geppetti P. (2007) 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(33):13519–13524.

## BIBLIOGRAFÍA

- Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris A. (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(10):1654–1661.
- Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee S, Hao Y, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I. (2006) Presenilins form ER  $\text{Ca}^{2+}$  leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell.* 126(5):981–93.
- Turner R, Tjian R. (1989) Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos–cJun heterodimers. *Science.* 243(4899):1689–1694.
- Ungvari U, Csiszar A, Kaminski P, Wolin M, Koller A. (2004) Chronic high pressure-induced arterial oxidative stress: involvement of protein kinase C-dependent NAD(P)H oxidase and local renin-angiotensin system. *Am J Pathol.* 165(1):219–226.
- Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov S, Ma Y, Fujimoto M, Quinn M, Pagano P, Johnson C, Alexander R. (2002) Novel Role of gp91phox-Containing NAD(P)H Oxidase in Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Signaling and Angiogenesis. *Circ Res.* 91(12):1160–1167.
- Ushio-Fukai M, Alexander R. (2004) Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem.* 264(1-2):85–97.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44–84.
- VanderJagt D, Harrison J, Ratliff D, Hunsaker L, Vander Jagt D. (2001) Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clin Biochem.* 34(4):265–270.
- Vanhoutte P. (2009) Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J.* 73(4):595–601.
- Vanhoutte P. (2011) Endothelium-dependent contractions in hypertension: When prostacyclin becomes ugly. *Hypertension.* 57(3):526–531.
- Vanhoutte P, Feletou M, Taddeim S. (2005) Endothelium- dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 144(4):449–458.
- Vanhoutte P, Shimokawa H, Tang E, Feletou M. (2009) Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol (Oxf).* 196(2):193–222.
- Vannier B, Peyton M, Boulay G, Brown D, Qin N. (1999) Mouse *trp2*, the homologue of the human *trpc2* pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5):2060–2064.
- Vazquez G, Wedel B, Kawasaki B, Bird G, Putney J. (2004) Obligatory role of Src kinase in the signaling mechanism for TRPC3 cation channels. *J Biol Chem.* 279(39):40521–40528.
- Venkatachalam K, Zheng F, Gill D. (2003) Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem.* 278(31):29031–29040.
- Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer H, Fei J, Elsing C, Kübler W, Kreuzer J. (2000) Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(4):940–948.

## BIBLIOGRAFÍA

- Vig M, DeHaven W, Bird G, Billingsley J, Wang H, Rao P, Hutchings A, Jouvin M, Putney J, Kinet J. (2008) Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat Immunol.* 9(1):89–96.
- Vig M, Peinelt C, Beck A, Koomoa D, Rabah D, Koblan–Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet J. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Science.* 312(5777):1220–1223.
- Vigili de Kreutzenberg S, Kiwanuka E, Tiengo A, Avogaro A. (2003) Visceral obesity is characterized by impaired nitric oxide-independent vasodilation. *Eur Heart J.* 24(13):1210–1215.
- Villalba N, Martínez P, Briones A, Sánchez A, Salaíces M, García-Sacristán A, Hernández M, Benedito S, Prieto D. (2009) Differential structural and functional changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297(2):H696–707.
- Villalba N, Stankevicius E, Garcia-Sacristán A, Simonsen U, Prieto D. (2007) Contribution of both  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization to the alpha1-adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(2):H1157–1169.
- Villalba N, Stankevicius E, Simonsen U, Prieto D. (2008) Rho kinase is involved in  $\text{Ca}^{2+}$  entry of rat penile small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294(4):1923–1932.
- Viola H, Arthur P, Hool L. (2007) Transient exposure to hydrogen peroxide causes an increase in mitochondria-derived superoxide as a result of sustained alteration in L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel function in the absence of apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res.* 100(7):1036–44.
- Virdis A, Bacca A, Colucci R, Duranti E, Fornai M, Materazzi G, Ippolito C, Bernardini N, Blandizzi C, Bernini G, Taddei S. (2013) Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: Role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation. *Hypertension.* 62(2):337–344.
- Virdis A, Santini F, Colucci R, Duranti E, Salvetti G, Rugani I, Segnani C, Anselmino M, Bernardini N, Blandizzi C, Salvetti A, Pinchera A, Taddei S. (2011) Vascular generation of tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *J Am Coll Cardiol.* 58(3):238–247.
- Viste K, Kopperud R, Christensen A, Døskeland S. (2005) Substrate enhances the sensitivity of type I protein kinase A to cAMP. *J Biol Chem.* 280(14):13279–13284.
- Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop J, Bindels R, Droogmans G, Penner R, Nilius B. (2001) CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem.* 276(51):47767–47770.
- Wagner S, Ruff H, Weber S, Bellmann S, Sowa T, Schulte T, Anderson M, Grandi E, Bers D, Backs J, Belardinelli L, Maier L. (2011) Reactive oxygen species-activated Ca/calmodulin kinase II $\delta$  is required for late I(Na) augmentation leading to cellular  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  overload. *Circ Res.* 108(5):555–565.
- Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. (2013) Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxid Redox Signal.* 18(9):1063–1077.
- Walder R, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger M, Beck G, Englehardt R, Carmi R, Sheffield V. (2002) Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet.* 31(2):171–174.

## BIBLIOGRAFÍA

- Walia M, Kwan CY, Grover AK. (2003) Effects of Free Radicals on Coronary Artery. *Med Princ Pract.* 12(1):1–9.
- Wamhoff B, Bowles D, Owens G. (2006) Excitation- transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ Res* 98: 868–878, 2006. *Circ Res.* 98(7):868–878.
- Wang Y, Deng X, Mancarella S, Hendron E, Eguchi S, Soboloff J, Tang X, Gill D. (2010) The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science.* 330(6000):105–109.
- Wang Z, Nicholls S, Rodriguez E, Kummu O, Horkko S, Barnard J, Reynolds W, Topol E, DiDonato J, Hazen S. (2007) Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med.* 13(10):1176–1184.
- Waring P. (2005) Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch Biochem Biophys.* 434(1):33–42.
- Warner T, Mitchell J. (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* 18(7):790–804.
- Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Böhm M, Nickenig G. (2004) Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res.* 94(4):534–41.
- Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 44(4):381–386.
- Watts S. (2002) Serotonin-induced contraction in mesenteric resistance arteries: signaling and changes in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension.* 39(3):825–829.
- Wei E, Kontos H, Beckman J. (1996) Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol.* 271(3):1262–1266.
- Weir E, Archer S. (2010) The role of redox changes in oxygen sensing. *Respir Physiol Neurobiol.* 174(3):182–191.
- Wes P, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. (1995) TRPC1, a human homolog of a *Drosophila* store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21):9652–9656.
- Wolin M. (2000) Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(6):1430–1442.
- Wolin M. (2009) Reactive oxygen species and the control of vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296(3):H539–H549.
- Wolin M, Burke-Wolin T, Mohazzab-H K. (1999) Roles of NADPH oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol.* 115(2):229–238.
- Wong PS, Garle MJ, Alexander SPH, Randall MD, Roberts RE. (2014) A role for the sodium pump in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced vasorelaxation in porcine isolated coronary arteries. *Pharmacol Res.* 90:25–35.
- Xanthoudakis S, Curran T. (1992) Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* 11(2):653–665.
- Xi Q, Cheranov S, Jaggar J. (2005) Mitochondria-derived reactive oxygen species dilate cerebral arteries by activating Ca<sup>2+</sup> sparks. *Circ Res.* 97(4):354–362.

## BIBLIOGRAFÍA

- Xie Q, Cho H, Calaycay J, Mumford R, Swiderek K, Lee T, Ding A, Troso T, Nathan C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 256(5054):225–228.
- Xu J, Carretero O, Liao T, Peng H, Shesely E, Xu J, Liu T, Yang J, Reudelhuber T, Yang X. (2010) Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 299(5):H1328–1338.
- Xu K, Zweier J, Becker L. (1997) Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase function by direct attack on the ATP binding site. *Circ Res*. 80(1):76–81.
- Xu L, Eu J, Meissner G, Stamler J. (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science*. 279(5348):234–237.
- Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. (2003) Hydrogen Peroxide, an Endogenous Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, Plays an Important Role in Coronary Autoregulation In Vivo. *Circulation*. 107(7):1040–1045.
- Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Shinozaki Y, Mori H, Goto M, Ogasawara Y, y Kajiya F. (2007) Important role of endogenous hydrogen peroxide in pacing-induced metabolic coronary vasodilation in dogs in vivo. *J Am Coll Cardiol*. 50(13):1272–1278.
- Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, Negoro T, Hiroi T, Kiuchi Y, Okada T, Kaneko S, Lange I, Fleig A, Penner R, Nishi M, Takeshima H, Mori Y. (2008) TRPM2-mediated  $Ca^{2+}$  influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med*. 14(7):738–747.
- Yamaoka K, Yakehiro M, Yuki T, Fujii H, Seyama I. (2000) Effect of sulfhydryl reagents on the regulatory system of the L-type Ca channel in frog ventricular myocytes. *Pflugers Arch*. 440(2):207–215.
- Yang D, Feletou M, Levens N, Zhang J, Vanhoutte P. (2003) A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. *Hypertension*. 41(1):143–148.
- Yang L, Doshi D, Morrow J, Katchman A, Chen X, Marx S. (2009) Protein kinase C isoforms differentially phosphorylate CaV1.2 a1c. *Biochemistry*. 48(28):6674–6683.
- Yang L, Liu G, Zakharov S, Morrow J, Rybin V, Steinberg S, Marx S. (2005) Ser1928 is a common site for CaV1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*. 280(1):207–214.
- Yang Z, Zheng T, Wang J, Zhang A, Altura BM. (1999) Hydrogen peroxide induces contraction and raises  $[Ca^{2+}]_i$  in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 360(6):646–653.
- Yetik-Anacak G, Catravas J. (2006) Nitric oxide and the endothelium: history and impact on cardiovascular disease. *Vascul Pharmacol*. 45(5):268–276.
- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nat Chem Biol*. 2(11):596–607.
- Yu Y, Fantozzi I, Remillard C, Landsberg J, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno D, Thistlethwaite P, Rubin L, Yuan J. (2004) Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(38):13861–13866.

## BIBLIOGRAFÍA

- Yu Y, Fukuda N, Yao E, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, Tahira Y, Ueno T, Matsumoto K. (2008) Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens.* 21(1):72–77.
- Yuan J, Zeng W, Dorwart M, Choi Y, Worley P, Muallem S. (2009) SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature Cell Biol.* 11(3):337–343.
- Yuan J, Zeng W, Huang G, Worley P, Muallem S. (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nature Cell Biol.* 9(6):636–645.
- Yung L, Leung F, Yao X, Chen Z, Huang Y. (2006) Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 6(1):1–19.
- Zafari A, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison D, Taylor W, Griendling KK. (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension.* 32(3):488–495.
- Zaidi A, Michaelis M. (1999) Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *Free Radic Biol Med.* 27(7-8):810–821.
- Zhang C, Hein T, Wang W, Kuo L. (2003) Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function. *Circ Res.* 92(3):322–329.
- Zhang C, Hein T, Wang W, Ren Y, Shipley R, Kuo L. (2006) Activation of JNK and xanthine oxidase by TNF- $\alpha$  impairs nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles. *J Mol Cell Cardiol.* 40(2):247–257.
- Zhang J, Wu Y, Williams B, Rodney G, Mandel F, Strasburg G, Hamilton S. (1999) Oxidation of the skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel alters calmodulin binding. *Am J Physiol.* 276(1 Pt 1):C46–53.
- Zhang J, Xia S, Block E, Patel J. (2002) NO upregulation of a cyclic nucleotide-gated channel contributes to calcium elevation in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283(4):C1080–1089.
- Zhu M. (2006) Multiple roles of calmodulin and other Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch.* 451(1):105–115.
- Zima A, Blatter L. (2006) Redox regulation of cardiac calcium channels and trans- porters, *Cardiovasc. Res.* 71 (2006) 310–321. *Cardiovasc Res.* 71(2):310–321.
- Zissimopoulos S, Docrat N, Lai F. (2007) Redox sensitivity of the ryanodine receptor interaction with FK506-binding protein. *J Biol Chem.* 282(10):6976–6983.
- Zou M, Shi C, Cohen R. (2002) Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest.* 109(6):817–826.
- Zweifach A, Lewis R. (1993) Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(13):6295–6299.

## **VIII. SUMMARY AND CONCLUSIONS**



**Signaling pathways involving hydrogen peroxide in the coronary arteries: role of calcium and alterations in obesity**

Reactive oxygen species (ROS), including  $\cdot\text{O}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ , are intermediate species in  $\text{O}_2$  oxidation-reduction reactions, which can act as second messengers being involved in various physiological and pathological processes (Paravicina and Touyz, 2006). When electrons are transferred to molecular  $\text{O}_2$ , various antioxidants including  $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and  $\text{HO}\cdot$  are generated.  $\cdot\text{O}_2^-$  also reacts with nitric oxide (NO) producing  $\text{ONOO}^-$ .  $\text{H}_2\text{O}_2$  is the most stable of these species and can diffuse through cell membranes, acting as a second messenger and playing an important role in the cardiovascular system, where both vasodilator and vasoconstrictor actions of  $\text{H}_2\text{O}_2$  has been reported (Paravicini and Touyz, 2006; Szasz et al., 2007; Valko et al., 2007; Madamanchi and Runge, 2013).

Oxidative stress is referred to conditions involving chronic levels of ROS and is associated with disease processes such as cardiovascular disease (Paravicina and Touyz, 2006). The intracellular redox state is controlled by the balance between oxidants and antioxidants. The main ROS-producing enzymes are NADPH oxidase, NO synthase, cyclooxygenase (COX) xanthine oxidase and enzymes of the mitochondrial respiratory chain (Valko et al., 2007; Lee and Griendling, 2008; Paravicini and Touyz, 2008; Montezano and Touyz, 2012; Madamanchi and Runge, 2013). The main ROS-metabolizing enzymes are catalase, superoxide dismutase, glutathione and thioredoxin; to a lesser extent are involved the ROS scavengers vitamins C and E (Yung et al., 2006; Szasz et al., 2007; Paravicini and Touyz, 2008; Jeong et al., 2012).

Under physiological conditions, formation and removal of ROS is held in a delicate balance to maintain the necessary levels of ROS for normal physiological function (Yung et al., 2006). These physiologically produced ROS contribute to maintaining adequate vascular tone and participate in signal transduction by regulating the activity of mitogen-activated protein kinases (MAPK), protein tyrosine phosphatases and protein tyrosine kinases and several transcription factors (Paravicini and Touyz, 2006; Yung et al., 2006; Breton-Romero and Lamas, 2014). When imbalances between activity and antioxidant enzymes are produced, a state known as oxidative stress, molecular and cell damage occur, contributing to the pathogenesis of various cardiovascular diseases such as hypertension, diabetes or heart disease (Yung et al., 2006). Oxidative stress is associated with an increase in ROS formation that modifies phospholipids and proteins leading to peroxidation and oxidation of thiol groups (Thomas et al., 2008; Bartosz, 2009; Madamanchi and Runge, 2013).

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

The redox signaling plays a key role in maintaining homeostasis in the circulation by regulating vasomotor activity and growth (Kuo et al., 2012).  $H_2O_2$  is capable of modifying vascular tone, producing vasodilation or vasoconstriction depending on the vascular bed and experimental conditions (Ardanaz and Pagano, 2006). Vasodilation induced by  $H_2O_2$  has been associated with endothelial release of several mediators such as nitric oxide or prostacyclin;  $H_2O_2$  has also been reported to act as an endothelium-derived hyperpolarizing factor (Matoba et al., 2000; Matoba et al., 2003) and to produce hyperpolarization through activation of  $K_{Ca}$  channels (Shimokawa, 2010).

Concentration and influx of  $Ca^{2+}$  in intracellular compartments is of great importance in the function of vascular smooth muscle and endothelial cells to control vascular tone (Song et al., 2011). The L-type voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels (VOC) play a critical role in increasing overall levels of  $Ca^{2+}$  during contraction of vascular smooth muscle (VSM) cells (Berridge, 2008). The VOC L-type channels of the plasma membrane are opened by depolarization of the membrane and allow the flow of  $Ca^{2+}$  into the cytoplasm. This increase in  $[Ca^{2+}]_i$  activates Myosin light-chain kinase and eventually causes contraction of smooth muscle (Bogeski et al., 2011).  $Ca^{2+}$  entry through the plasma membrane channels activates the ryanodine receptors of the sarcoplasmic reticulum, through the process of  $Ca^{2+}$  entry -induced  $Ca^{2+}$  release, inducing a further release of  $Ca^{2+}$ . Furthermore, activation of Inositol trisphosphate (IP3) receptor through IP3 production induced by agonists and the awareness of IP3 receptor by  $Ca^{2+}$  could induce an increased release of  $Ca^{2+}$  (Berridge, 2008; Trebak et al., 2010).

SOC (store-operated  $Ca^{2+}$ ) and receptor operated channels are formed by subunits of the family of transient receptor potential channels. SOC entry is the phenomenon whereby the depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores opens SOC type plasma membrane channels (Parekh y Putney, 2005). Following  $Ca^{2+}$  depletion in the sarcoplasmic reticulum, this deficiency of  $Ca^{2+}$  is detected and transmitted to the plasma membrane channels to allow the flow of  $Ca^{2+}$  into the cytoplasm, where then the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase (SERCA) kidnaps it to the sarcoplasmic reticulum, therefore recovering  $Ca^{2+}$  deposits (Song et al., 2011). STIM1 is the primary sensor of  $Ca^{2+}$  in the endoplasmic reticulum; when the  $Ca^{2+}$  deposit of the sarcoplasmic reticulum is depleted, STIM1 undergoes a conformational change that allows multimerized, translocates to the junction between the sarcoplasmic reticulum membrane and plasma membrane, binds with Orai1 tetramers in the plasma membrane and activates SOC channels (Roos et al., 2005; Song et al., 2011). Modulation of  $Ca^{2+}$  entry through non voltage-gated channels by ROS is characterized mainly in non-excitable cells including endothelial cells (Barlow and White 1998; Hu et al., 1998; Balzer et al., 1999; Redondo et al., 2004a; Redondo et

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

al., 2004b; Poteser et al., 2006). Information about ROS regulation of SOC entry in excitable VSM cells remains scarce.

The aims of the present study were 1) to determine the signaling pathways underlying the contractile effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat coronary arteries, 2) to assess whether there is a role for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the regulation of Ca<sup>2+</sup> entry in coronary arteries and 3) to determine the possible alterations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vasoactive actions and Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms in the coronary arteries in a rat model of metabolic syndrome (MS).

To conduct this study, segments of second and third order of the left descending coronary artery from Wistar and from obese Zucker rats, a model of MS/insulin resistance, were used. Concentration-response curves of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were performed in arteries precontracted with K<sup>+</sup>30 with and without endothelium. ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> production was determined by lucigenin chemiluminescence. Simultaneous measurements of Ca<sup>2+</sup> and isometric tension were performed by using Fura-2 fluorescence. Expression of COX-2 in the coronary arterial wall was determined by immunohistochemistry.

The results of the current study show that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> had a vasoconstrictor effect correlated to the internal lumen diameter of the vessel. While in the most proximal segments H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induces a predominant contractile effect, in more distal coronary branches a relaxing effect was observed, suggesting that the relaxing component of the response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is predominant in smaller vessels. In distal coronary arteries, the relaxing effect was abolished by depolarizing arteries with K<sup>+</sup>30, and in proximal coronary arteries this procedure induced a higher contractile effect, suggesting that the relaxing component of the action of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is mediated by activation of K<sup>+</sup> channels. The contractile effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was partially inhibited after mechanical removal of endothelium, suggesting that this effect is mediated by an endothelial-derived prostanoid; also supported by the inhibition of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced contraction after non-selective inhibition of COX and after blocking thromboxane (TP) receptor. This effect is directly related to the redox state of the arterial wall, as stimulation of the arteries with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced a marked increase in the production of ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> and incubation of the arteries with tempol markedly reduced both ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and the vasoconstrictor effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Furthermore, inhibition of NADPH oxidase also reduced the contractile effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, confirming the involvement of ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>. The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is mediated by MAPK activation, as inhibition of p38 and ERK MAPK decreased the contractile effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Inhibition of Rho kinase also reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and the depolarization with K<sup>+</sup>30-induced contractile effect, possibly due to the

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

activation of Rho kinase by  $\text{H}_2\text{O}_2$  can be induced by  $\text{Ca}^{2+}$  signaling underlying  $\text{H}_2\text{O}_2$  vasoconstriction in coronary arteries.

Vascular contraction induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  has been reported to involve both through  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization mechanisms. In coronary arteries, blocking VOC L-type channels reduced both basal and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced increases in tension and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Furthermore, mechanical removal of endothelium reduced both basal and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced increases in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and tension. Concerning the effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the *capacitative*  $\text{Ca}^{2+}$  entry in coronary arteries, experiments were conducted in a free- $\text{Ca}^{2+}$  medium in the presence of nifedipine to block L-type VOC channels. Under these conditions,  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced a modest increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , and re-addition of  $\text{Ca}^{2+}$  to the medium resulted in a marked increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  without major changes in tension in endothelium-denuded coronary arteries. This entry had a magnitude about half that induced by cyclopiazonic acid (CPA) and was concentration dependent, although supraphysiological concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  produce an inhibitory response on  $\text{Ca}^{2+}$  entry. This capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  involves non-selective cation channels, since it was reduced by the nonselective cation channel blocker gadolinium, while addition of  $\text{Ba}^{2+}$  to the medium instead of  $\text{Ca}^{2+}$  induces an increase in Fura-2AM ratio similar to that obtained with  $\text{Ca}^{2+}$ . The selective inhibitor of Orai1, Pyr6, produced an inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  entry mediated both by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and CPA, suggesting the involvement of SOC  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This action was due to an oxidation of thiol groups by  $\text{H}_2\text{O}_2$ , since the thiol specific reducing agent dithiothreitol inhibited the  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  but not by CPA.

In coronary arteries from obese Zucker rats, ROS production was increased and reduced after incubation with tempol. However, there were no significant differences in the vasoactive effects of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in coronary artery precontracted with serotonin or  $\text{K}^+30$ , although  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was higher in obese animals. Similar to that observed in healthy animals, nonselective inhibition of COX and TP receptor inhibited the contractile effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to a similar extent in lean and obese animals. Inhibition of COX-2 reduced the contractile effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in healthy animals but not in obese animals, but COX-2 inhibition had a similar effect in both groups of animals after mechanical removal of the endothelium, suggesting that the release of endothelial relaxing prostanoids derived from COX-2 would compensate the action of contractile prostanoids produced in the VSM. COX-2 expression higher in both o endothelium and VSM from obese rats, and acute exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  augmented COX-2 expression mainly in VSM. After COX-2 inhibition, a decrease in  $\cdot\text{O}_2^-$  production was observed suggesting that COX-2 is involved in the contractile effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by  $\cdot\text{O}_2^-$  production. Blockade of the prostacyclin receptor induced a modest inhibitory effect on

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

the vasoconstrictor effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which initially rules out an involvement of COX-2-derived prostacyclin.

Mobilization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by acute exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  was increased in coronary arteries from obese Zucker rats, although SOC entry induced by inhibition of SERCA was reduced, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  entry in response to  $\text{H}_2\text{O}_2$  is sensitized but SOC entry is down-regulated in coronary arteries under conditions of oxidative stress.

From these results we can conclude:

1.  $\text{H}_2\text{O}_2$  has a vasoconstrictor effect correlated to coronary vascular diameter. In the more distal coronary branches, the relaxing effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  predominates.
2. The vasoconstrictor effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the coronary arteries includes activation of COX and TP receptor, and stimulation of Rho kinase and MAPK. This effect is coupled to  $\text{Ca}^{2+}$  entry through L-type VOC channels in coronary VSM.
3.  $\text{H}_2\text{O}_2$  stimulates  $\cdot\text{O}_2^-$  generation by NADPH oxidase, which in turn contributes to the vasoconstrictor effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
4.  $\text{H}_2\text{O}_2$  mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores and activates a non-voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, which is inhibited at high concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and exhibits classic features of SOC type entry in non-excitable cells, being inhibited by gadolinium and reproduced by barium fluorescence.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx involves specific activation of Orai1 protein.
5. SOC  $\text{Ca}^{2+}$  entry in coronary VSM activated by  $\text{H}_2\text{O}_2$  is redox-sensitive and it is a result of the oxidation of thiol groups.
6. Both basal and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -stimulated  $\cdot\text{O}_2^-$  production is increased in coronary arteries from rats under conditions of MS. The vasoconstrictor effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  is not altered and includes activation of COX and TP receptor, despite  $\text{H}_2\text{O}_2$ -activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx is increased.
7. The absence of endothelium unmasked a contractile effect mediated by COX-2, in coronary arteries from obese rats, suggesting the involvement of both contractile and relaxing prostanoids derived from COX-2. The endothelium-dependent relaxant effect of COX-2 is not mediated by the activation of the IP receptor.
8. Increased expression of COX-2 in the coronary arterial wall of rats with MS is increased after acute exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , especially in VSM, and it is involved in the augmented  $\cdot\text{O}_2^-$  generation and vasoconstriction.
9. L-type VOC channel activation and modulation by  $\text{H}_2\text{O}_2$  is apparently unaffected under conditions of MS. However, store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by acute exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$  is increased while SOC  $\text{Ca}^{2+}$  entry obtained by inhibition of SERCA is down-regulated.

