

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Regulación de la entrada de calcio en arterias de resistencia:
papel de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y de las kinasas
activadas por mitógenos (MAPK)**

**Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and
phosphatidylinositol 3-kinasa (PI3k) in calcium signaling
pathways in resistance arteries**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alejandro Gutiérrez Cruz

Directoras

Dolores Prieto Ocejo
Ana Sánchez Pina

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



TESIS DOCTORAL

**REGULACIÓN DE LA ENTRADA DE CALCIO EN ARTERIAS DE
RESISTENCIA: PAPEL DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-KINASA (PI3K) Y
DE LAS KINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)**

**ROLE OF MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) AND
PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE (PI3K) IN CALCIUM SIGNALING
PATHWAYS IN RESISTANCE ARTERIES**

Alejandro Gutiérrez Cruz

Directoras: Dolores Prieto Ocejo y Ana Sánchez Pina

MADRID, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Alejandro Gutiérrez Cruz,
estudiante en el Programa de Doctorado Doctorado en Farmacia,
de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Regulación de la entrada de calcio en arterias de resistencia:
papel de la fosfatidilinositol 3-Kinase (PI3K) y de las quinasas activadas
por mitógenos (MAPK)

y dirigida por:

Profa. Dolores Prieto Ojejo
Dra. Ana Sánchez Pina

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 7 de julio de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Las doctoras Dolores Prieto Ocejo, Catedrática, y Ana Sánchez Pina, Profesora Contratada Doctor de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D. Alejandro Gutiérrez Cruz, Graduado en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado "REGULACIÓN DE LA ENTRADA DE CALCIO EN ARTERIAS DE RESISTENCIA: PAPEL DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-KINASA (PI3K) Y DE LAS KINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)" como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, junio de 2019

Dra. Prieto Ocejo

Dra. Sánchez Pina

A mis padres, a mi hermana y a mi abuela

“La verdadera ignorancia no es la ausencia de conocimientos, sino el hecho de rehusarse a adquirirlos”

(Karl Popper)

Agradecimientos

Este doctorado, en el que he aprendido mucho tanto a nivel profesional como personal, no habría sido posible sin la ayuda y el apoyo que me han aportado todas las personas de mi entorno y a las cuales me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento.

Primero quiero dar las gracias a la Profa. Dolores Prieto Ocejo, directora de esta Tesis Doctoral, por permitirme realizar este proyecto y depositar su confianza en mí. Gracias por el tiempo que me has dedicado y por el rigor científico con el que has trabajado estos cuatro años. Admiro muchísimo tu pasión por la ciencia y por la investigación, la cual comparto. Gracias también por haberme hecho apreciar y amar la fisiología aún más si cabe, y porque incluso en los peores momentos tu energía y entusiasmo siempre me han dado fuerzas para seguir adelante.

A la Dra. Ana Sánchez, codirectora de esta Tesis Doctoral, por ser una inestimable guía y proporcionarme ayuda en todo momento. Siempre has estado ahí para enseñarme y aconsejarme, mil gracias, de verdad. Conocerte y trabajar contigo ha sido una de las mejores cosas que me han pasado y que me han enriquecido como persona y como investigador. Eres increíble.

Al profesor Ulf Simonsen, por permitirme realizar una estancia predoctoral y acogerme como uno más en su equipo. Gracias por todo lo que me ha enseñado, por poner a mi disposición todo el material y equipamiento que he necesitado y por la gran formación que he obtenido en Dinamarca. Un gran científico que me ha mostrado pasión e interés por la investigación, pero sobre todo una profesionalidad científica incomparable. Espero poder trabajar en el futuro de nuevo con él. Mange tak!

Aprovecho para dar las gracias a los miembros del equipo del profesor Simonsen, Simón Comerma Steffensen, Heidi Knudsen, Susie Mogensen y a los estudiantes de doctorado por su disposición a ayudarme siempre que lo he necesitado y por todo lo que me han enseñado. Trabajar con ellos ha sido un verdadero placer y un honor.

También quería dar las gracias a todos los profesores del Departamento de Fisiología, por acogerme como uno más en esa gran familia que es el departamento. Todos me habéis aportado y enseñado algo (y no sólo en clase). Gracias al Prof. Luis Rivera, al Prof. García Sacristán, a la Dra. Belén Climent, a la Dra. Paz Recio, a la Profa. Sara Benedito, al Prof. Medardo Hernández, al Dr. Ángel Agís, a la Dra. Elvira López-Oliva y a la Dra. Rafaela Raposo. También debo nombrar a la Dra. Cristina Martínez, gran persona y profesora a la que todos echamos de menos.

Muchas gracias a Claudia por ayudarme cuando lo he necesitado, por nuestras risas y por animarme y entenderme siempre. Sin ti este camino no hubiera sido lo mismo. Eres una magnífica compañera, mucho ánimo con tu tesis que no te queda nada. Sabes que puedes contar conmigo para lo que necesites. Vales mucho, créetelo.

A Merche, muchas gracias por toda la ayuda y el apoyo que me has dado. Te lo he dicho mil veces y te lo repito una más: eres increíble y te admiro un montón. Espero que tengas mucha suerte y consigas lo que te propongas, porque eres capaz de todo y más.

A Cristina, muchísimas gracias por toda tu ayuda y tus ánimos. Eres la alegría que nos impulsa cada día. Porque, aunque te conozco desde hace apenas unos meses, ya no concibo el departamento sin ti. Quiero que sepas que te admiro y me pareces fantástica, no cambies nunca.

Gracias a Francisco Puente, Manuel Perales y a Macarena Martín, por su gran labor técnica y administrativa. Gracias por hacer del departamento un lugar mejor, aportando un lado divertido que nos hace el trabajo y la vida más fácil a todos. Sois magníficos.

A Silvia, por su amistad que dura ya más de 20 años y que es para toda la vida. Muchas gracias por estar ahí siempre, por ser mi confidente y mi apoyo incondicional, tanto en los buenos como en los malos momentos. Eres increíble y no concibo mi vida sin ti. Sabes que te quiero un montón, eres muy grande.

Gracias a Clara, pues a pesar de que al conocernos nos llevásemos como el perro y el gato, ahora eres de las personas más importantes para mí. Por estar siempre ahí, en los buenos y malos momentos, por aguantarme y por animarme. Mi vida sin ti no sería lo mismo ni habría llegado hasta aquí. Te quiero un montón, taichou.

A todos amigos del barrio: Ana, Carlos, Esther, Estrella, Igor, Irene, Javi, Jenny, Julia, Lorena, Noelia, Sanmi y Sarfi. Vuestro apoyo y vuestros ánimos han sido esenciales para mí, gracias por vuestro humor y por estar siempre a mi lado en los buenos y en los malos momentos. Los amigos son la familia que uno escoge voluntariamente y no podría imaginar mejores. Os quiero un montón.

A mis amigos de Farmacia: a Aída, a Isabel, a Luli, a Mario, a Mónica y a Raquel, sois increíbles. Muchas gracias por estar ahí, no podría haber llegado donde estoy sin vuestro apoyo y sin todos esos momentos de risas y diversión que le aportáis a mi vida. Mucha suerte en todo lo que hagáis, os merecéis lo mejor. Os quiero un montón.

Mención especial a Ike y a Miguel. Muchas gracias por todos vuestros ánimos y apoyo incondicional, por creer siempre en mí y por alegrarme la vida con ese humor tan “especial” (cuidado con el tamarindo). No imagino mi vida sin vosotros, vuestra amistad es un tesoro. Que sepáis que os aprecio muchísimo y os deseo lo mejor.

A Rhaquerys, probablemente la persona que mejor me ha comprendido en estos 4 años. Muchas gracias por estar ahí siempre, por escucharme y aguantar mis quejas. Gracias por tu apoyo y por todos los momentos buenos y malos que hemos compartido. Has hecho que sea más fácil recorrer este camino. Vales mucho, y todo esfuerzo al final tiene su recompensa, ya verás. Mucha suerte en lo que te queda de tesis, y sabes que estoy para lo que necesites. Un beso enorme (y shiny).

A Jorge, me alegro un montón de haberte conocido, eres genial y una gran persona. Contigo he ganado un valioso amigo con el que siempre se puede contar. Muchas gracias por todo, por tus ánimos, por aguantarme, y por supuesto, por todos esos momentos de delicioso té. No cambies nunca, y mucha suerte en todo lo que te propongas, eres grande. Danke schön!

A Sara, muchas gracias por todos los momentos que he vivido contigo, especialmente todos esos sábados juntos. Me animas la vida y me pareces maravillosa. Que sepas que vales un montón y que te mereces lo mejor. No cambies jamás, un beso enorme.

También quiero agradecer a mis amigos Bardia, Clareta, Gonçalinho, Judit, Laia, Olivier, Pablo y Santi todos los momentos que hemos compartido juntos, pues habéis sido mi familia durante medio año. Os echo de menos y espero veros muy pronto. Mucha suerte en todo y que os vaya todo muy bien, sois geniales.

A mi hermana Esther, gracias por ser cómo eres, por ayudarme, apoyarme, animarme y quererme como nadie. Te admiro un montón y eres lo que más quiero. Sabes que siempre estaré a tu lado para cuidarte y para lo que necesites. No podría tener una hermana mejor que tú. Te adoro.

Y por supuesto, a mis padres. Sin vuestro apoyo no estaría dónde estoy hoy ni sería lo que soy. Vosotros siempre estáis ahí, pase lo que pase, y me habéis enseñado que todo esfuerzo vale la pena y a luchar por lo que uno quiere. Esta tesis está especialmente dedicada a vosotros y a la abuela. Os quiero muchísimo.

Este proyecto de investigación fue financiado gracias a los Proyectos SAF2006-77526-R y SAF 2012-31631 del Ministerio de Economía y Competitividad

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
Ach	Acetilcolina
-AR	Adrenoceptor
ATII	Angiotensina II
BK_{Ca}	Canales de potasio activados por calcio
Ca²⁺	Catión calcio
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular
CaM	Calmodulina
Canales VOC	Canales de calcio operados por voltaje
Canal VOC tipo-L	Canal de calcio operado por voltaje tipo-L
CCR	Curva concentración-respuesta
CICR	Liberación de calcio inducida por calcio
CIF	Factor de influjo de calcio
Cl⁻	Anión cloruro
CMLV	Células del músculo liso vascular
CPA	Ácido ciclopiazónico
CPI-17	Proteína inhibidora de la MLCP específica del músculo liso
DAG	Diacilglicerol
DHP	Dihidropiridinas

DHPR	Receptor dihidropiridínico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERK1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2
ET	Endotelina
ET-1	Endotelina-1
ET_A	Receptor de endotelina A
ET_B	Receptor de endotelina B
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP₃	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
IP₃R	Receptor de IP ₃
K⁺	Catión potasio
KPSS	Solución salina fisiológica rica en potasio
KPSS⁰	Solución fisiológica rica en potasio, sin calcio y sin EGTA
KPSS^{0.1}	Solución fisiológica rica en potasio, sin calcio y con EGTA
MAPK	Proteín cinasa activada por mitógenos
MLC	Cadena ligera de miosina
MLC₂₀	Cadenas reguladoras ligeras de miosina

MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de miosina
MLV	Músculo liso vascular
MYPT1	Subunidad reguladora de la MLCP
NA	Noradrenalina
nNOS	Óxido nítrico sintasa neural
NO	Óxido nítrico
Orail	Canal de calcio activado por liberación de calcio 1
Phe	Fenilefrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato
PKA	Protein cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLCβ	Fosfolipasa C β
PSS	Solución salina fisiológica
PSS⁰	Solución salina fisiológica libre de calcio y sin EGTA
PSS^{0.1}	Solución fisiológica libre de calcio y con 0.1 mM de EGTA
RhoK	Rho cinasa

ROC	Canales operados por receptor
RS	Retículo sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
siRNA	ARN pequeño de interferencia
SOC	Canales operados por almacén
SOCE	Entrada de calcio operada por almacén
STIM1	Molécula de interacción del estroma sensora de calcio
STOC	Corrientes de salida transitorias espontáneas
TRP	Receptores de potencial transitorio



ÍNDICE

I. SUMMARY.....	1
II. RESUMEN.....	9
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
1. FISIOLÓGÍA DEL CALCIO EN LA VASOCONSTRICCIÓN ARTERIAL.....	19
1.1. Canales de Ca²⁺ en el músculo liso vascular	22
1.1.1. Canales de Ca ²⁺ operados por voltaje (VOC)	22
1.1.2. Canales de cationes no selectivos.....	30
1.1.3. Canales de Ca ²⁺ en la membrana del Retículo Sarcoplásmico y Ca ²⁺ ATPasa	34
2. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN EN EL MLV	39
2.1. Mecanismos de entrada y movilización de Ca²⁺ en el MLV	42
2.1.1. Liberación de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico (RS).....	42
2.1.2. Entrada de Ca ²⁺ extracelular en el MLV	43
2.2. Mecanismos de sensibilización al Ca²⁺	43
3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-TRANSCRIPCIÓN EN EL MLV	45
4. VÍAS INTRACELULARES DE SEÑALIZACIÓN DE Ca²⁺ ACOPLADAS A RECEPTOR EN EL MLV	48
4.1. Receptores adrenérgicos	48
4.2. Receptores de endotelina	49
5. PAPEL DE LAS PROTEÍN CINASAS EN LA SEÑALIZACIÓN DE Ca²⁺ ACOPLADA A RECEPTOR	52

5.1. Fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3Ks)	52
5.1.1. Regulación del canal VOC tipo-L por las PI3Ks	53
5.2. Proteín cinasas activadas por mitógenos (MAPK)	55
5.2.1. Regulación del canal VOC tipo-L por las MAPK.....	57
5.3. Proteín cinasa C (PKC)	57
5.3.1. Regulación del canal VOC tipo-L por la proteín cinasa C (PKC).....	59
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61
V. MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. MATERIAL	69
1.1. Material biológico	69
1.2. Material de laboratorio	70
1.2.1. Instrumentación general	70
1.2.2. Equipamiento para registrar la tensión isométrica de las micropreparaciones arteriales.....	70
1.2.3. Equipamiento para el registro simultáneo de la concentración intracelular de Ca ²⁺ y de la tensión isométrica en micropreparaciones arteriales	71
1.3. Reactivos	71
1.4. Soluciones	73
1.4.1. Soluciones fisiológicas	73
1.4.2. Soluciones de calibración para los experimentos de fura-2	75

2. MÉTODOS	76
2.1. Metodología para estudios funcionales.....	76
2.1.1. Estudio de la reactividad arterial	76
2.1.2. Determinación del Ca^{2+} intracelular por ratio-fluorimetría.....	77
2.1.3. Protocolos experimentales para los estudios funcionales.	79
2.2. Cálculo y análisis estadístico de los resultados	81
VI. RESULTADOS.....	83
1. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA.....	85
1.1. Mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor α_1-adrenérgico en arterias de resistencia	85
1.2. Mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor de ET en arterias de resistencia.....	91
2. PAPEL DE LA PI3K EN LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA	97
2.1. La inhibición de la PI3K redujo la movilización de Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} inducidas por Phe	97
2.2. La inhibición de la isoforma PI3Kδ redujo la vasoconstricción acoplada al receptor α_1-adrenérgico	97
2.3. La inhibición de la PI3K redujo la movilización de Ca^{2+} sin afectar a la contracción asociada ni a la entrada de Ca^{2+} inducidas por ET-1	101
3. PAPEL DE LA MAPK EN LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA	105

3.1. La inhibición de la ERK-MAPK redujo la entrada de Ca^{2+} pero no la vasoconstricción acoplada al receptor α_1 -adrenérgico.....	105
3.2. La inhibición de la p38-MAPK no afectó a la vasoconstricción acoplada al receptor α_1 -adrenérgico	105
3.3. La inhibición de la ERK-MAPK no afectó a la movilización de Ca^{2+} , a la entrada de Ca^{2+} ni a la vasoconstricción inducidas por la activación del receptor de ET	108
4. PAPEL DE LA PKC EN LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA	111
4.1. La inhibición de la PKC redujo la entrada de Ca^{2+} y en menor medida la contracción inducida por Phe.....	111
4.2. La inhibición de la PKC redujo la entrada de Ca^{2+} y la vasoconstricción acopladas al receptor de ET	111
5. MECANISMOS DE MODULACIÓN DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} REGULADOS POR CINASAS EN ARTERIAS DE RESISTENCIA.....	117
5.1. La inhibición de la ERK-MAPK, PI3K y PKC redujo la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L.....	117
5.1.1. La inhibición de la isoforma PI3K δ redujo la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L.....	117
5.2. La inhibición de las vías de la ERK-MAPK, PI3K y PKC redujo la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L independientemente del receptor de rianodina (RyR)	120
VII. DISCUSIÓN	125
VIII. CONCLUSIONES.....	139
IX. BIBLIOGRAFÍA	145



I. SUMMARY

Role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in calcium signaling pathways in resistance arteries

INTRODUCTION

Insulin resistance states result in the impairment of insulin vascular actions that depend on PI3K/nitric oxide (NO) and MAPK/Endothelin-1 (ET-1) signaling pathways. This imbalance leads to an exacerbated vascular contraction and endothelial dysfunction (Kim *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2013). However, alterations of calcium (Ca^{2+}) homeostasis in vascular smooth muscle (VSM) are associated with abnormal vasoconstriction and vascular complications in metabolic disease (Okon *et al.*, 2005, Ford *et al.*, 2010; Villalba *et al.*, 2011).

In VSM, contraction depends on the elevation of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) due to extracellular Ca^{2+} entry and/or Ca^{2+} mobilization from the stores in the sarcoplasmic reticulum followed by activation of myosin light chain (MLC) kinase, MLC phosphorylation and the subsequent formation of actin/myosin crossbridges (Liu & Khalil, 2018). However, increases in contractile force development can also occur at a given $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a process mediated by Ca^{2+} sensitization mechanisms (Somlyo & Somlyo, 2003; Villalba *et al.*, 2007).

Ca^{2+} entry through voltage-dependent L-type channels ($\text{Ca}_v1.2$) plays a key role in arterial vasoconstriction but also in Ca^{2+} -dependent gene transcription of VSM (Kudryavtseva *et al.*, 2013). These channels can be target of several kinases that regulate multiple signaling pathways, participating in the modulation of vascular smooth muscle contractility (Morello *et al.*, 2009).

It has also been reported that ET-1 is responsible for the maintenance of vascular tone, causing a strong vasoconstriction in VSM (Wagner *et al.*, 1992). Hypertension and augmented vasoconstriction associated to vascular diseases such as diabetes or metabolic syndrome have been reported to be related to Ca^{2+} sensitization of contractile

Summary

machinery in VSM mediated by protein kinases (Martínez *et al.*, 2000; Naik *et al.*, 2006; Villalba *et al.*, 2007, 2011; Crestani *et al.*, 2017).

RhoK and PKC are kinases associated to Ca²⁺ sensitization mechanisms related to smooth muscle vasoconstriction (Nobe & Paul, 2001, Somlyo & Somlyo, 2003; Villalba *et al.*, 2007). Furthermore, there is experimental evidence that supports the regulation of intracellular Ca²⁺ mobilization and extracellular Ca²⁺ entry by protein kinases in cardiac myocytes and VSM (Ghisdal *et al.*, 2003; Villalba *et al.*, 2008; Smani *et al.*, 2010).

The relative contribution of Ca²⁺ sensitization processes to vascular contraction has been proven to be dependent on vessel size (Kitazawa & Kitazawa, 2012; Martinsen *et al.*, 2012). Small resistance arteries play an important role in maintaining and regulating blood pressure, and their vasoconstrictor ability is controlled by the sympathetic nervous system. This vasoconstriction appears augmented as a common vascular complication in metabolic syndrome and insulin resistant states (Ford, 2005).

AIMS

The aim of this study was to assess the role of the kinases PI3K, MAPK and PKC in Ca^{2+} signaling pathways coupled to the α_1 -adrenergic receptor and the ET-1 receptor in resistance arteries. The specific aims were the following:

1. To determine the relative contribution of Ca^{2+} entry, Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} sensitization to vasoconstriction mediated by the α_1 -adrenergic receptor in resistance arteries.
2. To assess whether kinases PI3K, MAPK and PKC participate in the regulation of Ca^{2+} signaling mechanisms coupled to the α_1 -adrenergic receptor.
3. To determine the relative contribution of Ca^{2+} entry, Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} sensitization to vasoconstriction mediated by the ET-1 receptor in resistance arteries.
4. To evaluate whether kinases PI3K, MAPK and PKC take part in the regulation of Ca^{2+} signaling mechanisms coupled to the ET-1 receptor.

METHODS

Simultaneous measurements of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and tension were performed by fura-2AM ratiofluorometry in 3rd order branches of mesenteric arteries from male Wistar rats mounted in microvascular myographs. Concentration-response curves for CaCl_2 were performed in arteries activated with phenylephrine (Phe) or ET-1 kept in Ca^{2+} -free solutions, in the absence (controls) and the presence of a selective blocker of L-type Ca^{2+} channels (nifedipine), an inhibitor of the Orai1-mediated Ca^{2+} entry or specific inhibitors of ERK-MAPK, p38-MAPK, PI3K and PKC.

RESULTS

Activation of α_1 -adrenoceptors with Phe stimulated intracellular Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} entry along with contraction in resistance arteries. Both $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and contractile responses were inhibited by nifedipine, while CPA abolished intracellular Ca^{2+} mobilization and reduced Ca^{2+} entry.

Inhibition of ERK-MAPK with PD-98059 did not alter intracellular Ca^{2+} mobilization but largely reduced L-type Ca^{2+} entry elicited by Phe without affecting vasoconstriction. The PI3K blocker LY-294002 moderately reduced intracellular Ca^{2+} release, Ca^{2+} entry and contraction induced by the α_1 -adrenoceptor agonist, while PKC inhibition decreased Phe-elicited Ca^{2+} entry and slightly reduced contraction without affecting intracellular Ca^{2+} mobilization. The PKC inhibitor GF-109203X diminished Ca^{2+} entry and to a lesser extent the associated contraction but did not affect intracellular Ca^{2+} mobilization.

Stimulation of ET receptors with ET-1 caused both intracellular Ca^{2+} mobilization and extracellular Ca^{2+} entry along with contraction. These responses were inhibited by nifedipine, likewise α_1 -adrenergic contraction. PI3K inhibition with LY-294002 reduced intracellular Ca^{2+} mobilization without affecting contraction or extracellular Ca^{2+} entry coupled to the ET receptor. The MAPK inhibitor PD-98059 did not have any significant effect on intracellular Ca^{2+} mobilization, Ca^{2+} entry or vasoconstriction induced by activation of the ET receptor. Under conditions of ryanodine receptor (RyR) blockade to inhibit Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR), inhibitors of PI3K, ERK-MAPK, and PKC significantly reduced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increases but not contraction elicited by high K^+ depolarization.

CONCLUSIONS

1. α_1 -adrenergic vasoconstriction is mediated by intracellular Ca^{2+} mobilization, by Ca^{2+} entry through voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels and by Ca^{2+} sensitization mechanisms in resistance arteries.
2. PI3K stimulates intracellular Ca^{2+} mobilization, Ca^{2+} entry and vasoconstriction without affecting Ca^{2+} sensitization mechanisms coupled to the α_1 -adrenergic receptor.
3. MAPK regulates Ca^{2+} entry unrelated to α_1 -adrenergic vasoconstriction, so it is not associated to Ca^{2+} sensitization mechanisms of contractile machinery.
4. PKC, probably a Ca^{2+} -dependent conventional isoform, participates in Ca^{2+} entry regulation but not in Ca^{2+} sensitization mechanisms coupled to the α_1 -adrenergic receptor.
5. ET-coupled vasoconstriction in VSM depends on intracellular Ca^{2+} mobilization, on Ca^{2+} entry through both voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels, store operated channels and on Ca^{2+} sensitization mechanisms in resistance arteries.
6. PI3K stimulates intracellular Ca^{2+} mobilization not related to vasoconstriction, while MAPK does not seem to be involved in Ca^{2+} sensitization mechanisms coupled to the ET receptor.
7. PKC participates in extracellular Ca^{2+} entry, inhibits Ca^{2+} mobilization from intracellular stores and is involved in Ca^{2+} sensitization mechanisms coupled to the ET receptor in VSM.
8. The kinases PI3K, MAPK and PKC selectively regulate Ca^{2+} entry through voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels in resistance arteries independently of the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release mechanism elicited by membrane depolarization.



II. RESUMEN

Regulación de la entrada de calcio en arterias de resistencia: papel de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y de las kinasas activadas por mitógenos (MAPK)

INTRODUCCIÓN

La resistencia a la insulina produce la alteración de acciones vasculares que dependen de las vías de señalización de la PI3K/óxido nítrico (NO) y de la MAPK/Endotelina-1 (ET-1). Este desequilibrio desemboca en una contracción exacerbada y disfunción endotelial (Kim *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2013). Sin embargo, las alteraciones de la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) en el músculo liso vascular (MLV) se asocian a vasoconstricción anormal y a complicaciones vasculares en enfermedades metabólicas (Okon *et al.*, 2005, Ford *et al.*, 2010; Villalba *et al.*, 2011).

En el MLV, la contracción depende del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) debido a la entrada de Ca^{2+} extracelular y/o la movilización de Ca^{2+} de los almacenes del retículo sarcoplásmico (RS) seguido por la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) y la formación de los puentes cruzados de actina/miosina (Liu & Khalil, 2018). Sin embargo, incrementos en la fuerza contráctil pueden ocurrir a una determinada $[\text{Ca}^{2+}]_i$, proceso denominado sensibilización al Ca^{2+} (Somlyo & Somlyo, 2003; Villalba *et al.*, 2007).

La entrada de Ca^{2+} a través de los canales dependientes de voltaje tipo-L ($\text{Ca}_v1.2$) es fundamental en la contracción arterial y en la transcripción génica en el MLV (Kudryavtseva *et al.*, 2013). Estos canales son diana de cinasas que regulan múltiples vías de señalización, modulando la contractilidad del MLV (Morello *et al.*, 2009).

También se ha descrito que el péptido vasoconstrictor ET-1 es responsable del mantenimiento del tono vascular en el MLV (Wagner *et al.*, 1992). La hipertensión y la vasoconstricción aumentadas asociadas a enfermedades vasculares se han relacionado con la sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil del MLV mediada por proteínas

cinastas (Martínez *et al.*, 2000; Naik *et al.*, 2006; Villalba *et al.*, 2007, 2011; Crestani *et al.*, 2017).

Las cinastas RhoK y la PKC se asocian a los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} relacionados con la contracción del MLV (Nobe and Paul, 2001; Somlyo & Somlyo, 2003; Villalba *et al.*, 2007). Además, existe evidencia experimental que apoya la regulación de la movilización del Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} por cinastas en miocitos cardiacos y en el MLV (Ghisdal *et al.*, 2003; Villalba *et al.*, 2008; Smani *et al.*, 2010).

La contribución relativa de los procesos de sensibilización al Ca^{2+} a la contracción es dependiente del tamaño del vaso (Kitazawa & Kitazawa, 2012; Martinsen *et al.*, 2012). Las arterias de resistencia participan en la regulación de la presión sanguínea, y su capacidad vasoconstrictora es regulada por el sistema nervioso simpático. Esta vasoconstricción aparece aumentada en el síndrome metabólico y en estados de resistencia a insulina (Ford, 2005).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de las cinasas PI3K, MAPK y PKC en las vías de señalización al Ca^{2+} acopladas al receptor α_1 -adrenérgico y al receptor de ET en arterias de resistencia. Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar la contribución relativa a la vasoconstricción mediada por el receptor α_1 -adrenérgico de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} , movilización de Ca^{2+} intracelular y de sensibilización al Ca^{2+} en arterias de resistencia.
2. Evaluar si las cinasas PI3K, MAPK y PKC participan en la regulación de los mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico.
3. Determinar la contribución relativa a la vasoconstricción mediada por el receptor de ET de la entrada de Ca^{2+} , movilización de Ca^{2+} intracelular y mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en el MLV de arterias de resistencia.
4. Evaluar si las cinasas PI3K, MAPK y PKC participan en la regulación de los mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor de ET.

MÉTODOS

Se realizaron medidas simultáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ y tensión mediante la técnica ratiofluorimétrica fura-2AM en ramas de tercer orden de arterias de resistencia mesentéricas, procedentes de ratas Wistar macho adultas y montadas en un miógrafo microvascular. Con ese fin fueron realizadas curvas concentración-respuesta (CCR) para el $CaCl_2$ en arterias activadas con fenilefrina (Phe) o ET-1 y mantenidas en soluciones fisiológicas libres de Ca^{2+} . Dichas curvas se realizaron en ausencia (controles) y en presencia de un bloqueante selectivo de los canales de Ca^{2+} tipo-L dependientes de voltaje (nifedipina), de un inhibidor de la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1 o inhibidores específicos de la ERK-MAPK, p38-MAPK, PI3K y PKC.

RESULTADOS

La activación de los receptores α_1 -adrenérgicos con Phe estimuló la movilización de Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} junto a la contracción en arterias de resistencia. Tanto las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ como de la contracción fueron inhibidas por nifedipina mientras que el CPA eliminó la movilización de Ca^{2+} intracelular y redujo moderadamente la entrada de Ca^{2+} .

La inhibición de la ERK-MAPK con PD-98059 no afectó a la movilización de Ca^{2+} pero redujo significativamente la entrada de Ca^{2+} tipo-L inducida por Phe sin alterar la vasoconstricción. El inhibidor de la PI3K LY-294002 redujo de forma moderada la movilización de Ca^{2+} intracelular, la entrada de Ca^{2+} y la contracción inducidas por la activación del receptor α_1 -adrenérgico, mientras que la inhibición de la PKC disminuyó la entrada de Ca^{2+} inducida por Phe y en menor medida la contracción sin afectar a la movilización de Ca^{2+} intracelular. El inhibidor de la PKC GF-109203X redujo la entrada de Ca^{2+} y la contracción asociada pero no afectó a la movilización de Ca^{2+} intracelular.

Resumen

La estimulación de los receptores de ET causó la movilización de Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} junto a la contracción. Estas respuestas fueron inhibidas con nifedipina, de igual modo a la vasoconstricción α_1 -adrenérgica. La inhibición de la PI3K con LY-294002 redujo la movilización de Ca^{2+} intracelular sin afectar a la contracción y a la entrada de Ca^{2+} extracelular acopladas al receptor de ET. El inhibidor de la MAPK PD-98059 no mostró ningún efecto significativo sobre la movilización de Ca^{2+} intracelular, sobre la entrada de Ca^{2+} y sobre la vasoconstricción inducidas por la activación del receptor de ET. El inhibidor de la PKC GF-109203X redujo la entrada de Ca^{2+} y la vasoconstricción acoplada al receptor de ET, pero produjo un incremento de la movilización de Ca^{2+} intracelular acoplada a dicho receptor. Bajo condiciones de bloqueo del receptor de rianodina (RyR) para inhibir la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR), los inhibidores de las tres cinasas disminuyeron de forma significativa los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pero no la contracción tras la despolarización de la membrana con una solución rica en K^+ .

CONCLUSIONES

1. La vasoconstricción α_1 -adrenérgica está mediada por la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, por la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L y canales SOC, y por mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en arterias de resistencia.
2. La PI3K estimula la movilización de Ca^{2+} intracelular, la entrada de Ca^{2+} y la vasoconstricción sin afectar a los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico.
3. La MAPK regula la entrada de Ca^{2+} no asociada a la vasoconstricción α_1 -adrenérgica, por lo que no se encuentra asociada a los procesos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil.
4. La PKC, posiblemente una isoforma convencional dependiente de Ca^{2+} , participa en la regulación de la entrada de Ca^{2+} pero no en los procesos de sensibilización al Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico.
5. La vasoconstricción acoplada al receptor de ET en el MLV depende de la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L y canales SOC, y de mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en arterias de resistencia.
6. La PI3K estimula la movilización de Ca^{2+} intracelular no asociada a contracción mientras que la MAPK no parece estar implicada en los mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor de ET.
7. La PKC participa en la entrada de Ca^{2+} extracelular, inhibe la movilización de los depósitos intracelulares y está implicada en la sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil acoplados al receptor ET en el MLV.
8. Las cinasas PI3K, MAPK y PKC regulan de forma selectiva la entrada de Ca^{2+} tipo-L en el MLV de arterias de resistencia independientemente del mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana.



III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. FISIOLÓGÍA DEL CALCIO EN LA VASOCONSTRICCIÓN ARTERIAL

En el citosol celular, la concentración de calcio (Ca^{2+}) se mantiene a niveles bastante bajos (10^{-7}M), aproximadamente cuatro órdenes de magnitud por debajo de los niveles de Ca^{2+} extracelular. Existen unos depósitos intracelulares de Ca^{2+} capaces de acumular Ca^{2+} en su interior hasta alcanzar una concentración de Ca^{2+} similar a la extracelular. La homeostasis del Ca^{2+} se obtiene a través de la regulación de los flujos de Ca^{2+} que existen entre estos tres compartimentos: citosol, medio extracelular y depósitos intracelulares (Tsien & Tsien, 1990).

El Ca^{2+} es continuamente bombeado desde el citosol hacia los otros compartimentos por bombas de Ca^{2+} con actividad ATPasa presentes tanto en la membrana plasmática como en las membranas de los depósitos. Estas bombas requieren del gasto de energía metabólica en forma de ATP para transferir el Ca^{2+} en contra de un gradiente de concentración (Berridge & Bootman, 1998).

Durante el estado de reposo de la célula, los canales que permiten la entrada de Ca^{2+} se encuentran cerrados mientras que las bombas ATPasas van a tener una actividad incrementada para así mantener una baja concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Cuando la célula pasa del reposo a un estado de actividad, los canales de Ca^{2+} se abren permitiendo la entrada de Ca^{2+} en el citosol, que al aumentar va a dar lugar a una gran variedad de respuestas fisiológicas. La regulación de la actividad de estos canales es vital para el correcto y preciso control de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tsien & Tsien, 1990).

Se han descrito numerosos tipos de canales que permiten el paso de iones Ca^{2+} . En muchos tipos celulares, la interacción de un agonista con un receptor específico de la membrana plasmática da lugar a la formación de un segundo mensajero que provoca una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante la consecuente apertura de canales presentes en la membrana de los depósitos intracelulares (Wu *et al.*, 1992; Berridge, 1993; Misárková *et al.*, 2016). Las mitocondrias son también capaces de almacenar y liberar Ca^{2+} , sin embargo, parecen operar a concentraciones de Ca^{2+} muy por encima de los valores normales en reposo, por lo que no parecen desempeñar un papel importante en el control de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Tsien & Tsien, 1990).

Revisión Bibliográfica

Las arterias de resistencia y las arteriolas juegan un papel esencial en la homeostasis del sistema cardiovascular y del organismo, ya que actúan como el sistema principal de resistencia vascular que media la regulación de la presión sanguínea y la distribución del gasto cardiaco a través de todos los órganos y tejidos del cuerpo para proporcionar los recursos metabólicos y fisiológicos que estos demandan (Davis *et al.*, 2011).

Las células del músculo liso vascular (CMLV) que conforman la pared de las arterias de resistencia y las arteriolas sirven como efectores primarios en la regulación activa de la resistencia vascular mediante la modulación del estado de contracción de estas células o tono vascular (Davis *et al.*, 2011). El tono vascular de las arterias de resistencia y de las arteriolas depende de la presión de la sangre que circula por estos vasos, así como del balance entre las señales vasoconstrictoras y vasodilatadoras que les afectan (Davis *et al.*, 2011).

La presión sanguínea, mediante el estiramiento de las CMLV, activa las vías de señalización para producir el tono miogénico, una característica distintiva de las arterias de resistencia y arteriolas (D'Angelo *et al.*, 1997; Davis & Hill, 1999; Davis, 2012; Gonzales *et al.*, 2014). El tono miogénico establece la línea base de la contracción de las CMLV sobre la cual actúan las señales vasoconstrictoras y vasodilatadoras producidas por agentes como neurotransmisores, hormonas, diversos metabolitos, iones y sustancias derivadas del endotelio, y es de suma importancia para el correcto mantenimiento de la homeostasis vascular (Davis *et al.*, 2011).

La contracción del músculo liso vascular (MLV) se inicia por un aumento de la concentración de iones Ca^{2+} en el citosol celular, ya sea debido a su entrada directa desde el espacio extracelular como consecuencia de la acción de neurotransmisores, hormonas u otros agonistas, o por su liberación desde los depósitos intracelulares, principalmente del retículo sarcoplásmico (RS) (Misárková *et al.*, 2016). El mecanismo mejor caracterizado es el de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOC), concretamente el canal de Ca^{2+} tipo-L (canal VOC tipo-L) sensible a dihidropiridinas (DHP) (Misárková *et al.*, 2016).

Revisión Bibliográfica

Sin embargo, en el músculo liso existen otros tipos de canales permeables al Ca^{2+} no dependientes de un cambio de voltaje, como son los canales operados por receptor (ROC), que son activados por agonistas que se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCR), o los canales operados por almacén (SOC), los cuales se activan al producirse una depleción de los depósitos intracelulares (McFadzean & Gibson, 2002).

El Ca^{2+} actúa como segundo mensajero en una gran variedad de procesos a nivel intracelular. En el músculo liso, un incremento de su concentración en el citosol celular permite la fosforilación de las cadenas reguladoras ligeras de miosina (MLC_{20}) y la contracción muscular mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} (Somlyo & Somlyo, 2003). El Ca^{2+} citosólico se une a la calmodulina (CaM), proteína a la que pueden unirse hasta cuatro iones Ca^{2+} , favoreciendo un cambio conformacional que conlleva la exposición de sitios de interacción con otras proteínas, siendo una de ellas la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), la cual es activada mediante dicha interacción.

La MLCK, una vez activada, da como resultado la fosforilación de las MLC_{20} . El cese de la contracción se debe, por un lado, al descenso en la concentración de Ca^{2+} citosólico que conduce a una disminución de la actividad de la MLCK, y por otro lado, a la desfosforilación de la MLC_{20} por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) (Somlyo & Somlyo, 1994; Somlyo & Somlyo, 2000; Somlyo & Somlyo, 2003).

Para un aumento determinado de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), la estimulación del MLV con agonistas origina normalmente un desarrollo de la fuerza de contracción mayor que el provocado por la despolarización de la membrana. Además, la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tensión también cambia durante el transcurso de la contracción muscular. El proceso por el cual la contracción se produce sin un incremento proporcional de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se denomina sensibilización al Ca^{2+} , en el cual la regulación de la actividad de la MLCP juega un papel fundamental (Somlyo & Somlyo, 1994).

A pesar de que este mecanismo es bastante complejo, se considera el de la vía RhoA/RhoK el más aceptado, aunque existen otras cinasas implicadas como la proteína cinasa C (PKC) (Somlyo & Somlyo, 1994; Masuo *et al.* 1994; Somlyo & Somlyo, 2000).

1.1. Canales de Ca^{2+} en el músculo liso vascular

El Ca^{2+} juega un importante papel en diferentes procesos como la excitación, contracción, transcripción y proliferación de las CMLV. En las últimas décadas se ha descubierto que las CMLV expresan una serie de canales que permiten una correcta regulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se producen principalmente por flujos de Ca^{2+} que discurren a través de canales permeables al Ca^{2+} , tanto dependientes como independientes de voltaje, y que están presentes en la membrana plasmática, así como por la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Ghosh *et al.*, 2017).

1.1.1. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje (VOC)

Los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (canales VOC) se encuentran en la membrana plasmática de una gran variedad de células excitables, y presentan diferentes propiedades electrofisiológicas, lo que les confiere la capacidad de actuar en diversos procesos fisiológicos (Catterall, 2011).

Las primeras clasificaciones de estos canales fueron realizadas por Carbone & Lux (1984) y Nowycky (1985). Esas clasificaciones los diferenciaron entre dos grandes subgrupos en función del rango de voltaje en el que se produce su activación.

Se denominaron canales de bajo umbral de activación aquellos que se activan por voltajes superiores a -50mV . Son canales que se pueden abrir en respuesta a pequeñas despolarizaciones desde potenciales de membrana bastante negativos. Por otro lado, se consideraron canales de alto umbral de activación aquellos cuya activación se produce por voltajes superiores, en el rango de -30mV a -20mV . Otras características biofísicas y farmacológicas van a permitir definir los diferentes subtipos de canales dentro de estos dos grandes subgrupos (Carbone & Lux, 1984; Nowycky, 1985).

Dentro del subgrupo de los canales de bajo umbral de activación tan sólo se ha identificado un subtipo de canal, denominado T (de “transient”). Este tipo de canal fue descrito por primera vez por Carbone & Lux (1984) y recibe su nombre por sus características cinéticas, al tratarse de un canal con una rápida inactivación cuando se mantiene el potencial de membrana de la célula en -50mV . Farmacológicamente se caracterizan por su insensibilidad a las DHP como la nifedipina y el Bay K8644.

Los canales T han sido identificados en una gran variedad de células, incluyendo tanto neuronas centrales como periféricas, células musculares cardíacas, esqueléticas y musculares lisas, e incluso han sido descritas en fibroblastos. En los tejidos excitables, la presencia de este tipo de canal se relaciona con una actividad rítmica tipo marcapasos (Carbone & Lux, 1984).

Los canales de alto umbral de activación fueron descritos como L, debido a que las corrientes de entrada de Ca^{2+} a través de ellos son de larga duración durante la despolarización de la membrana. Esto, junto a su sensibilidad a las DHP, sirvió para diferenciarlos de los canales T (Carbone & Lux, 1984). Dentro de los canales de alto umbral de activación se han caracterizado las subfamilias -L, -N, -P/Q y -R, clasificadas según la similitud de sus secuencias aminoacídicas y sus características electrofisiológicas (Zamponi *et al.*, 2015).

1.1.1.1. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo-L (canales VOC tipo-L)

Se han descrito cuatro isoformas diferentes de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo-L (canales VOC tipo-L): $\text{Ca}_v1.1.$, $\text{Ca}_v1.2.$, $\text{Ca}_v1.3.$ y $\text{Ca}_v1.4.$ Estos canales se encuentran prácticamente en todas las células excitables, así como en muchos tipos de células no excitables. Además, poseen propiedades farmacológicas similares pero se diferencian en la distribución de los mismos en los tejidos y en sus propiedades biofísicas (Zamponi *et al.*, 2015; Figura I).

La isoforma $\text{Ca}_v1.2$ representa la principal vía de entrada de Ca^{2+} en el MLV. La activación de este tipo de canales depende de un cambio en el potencial de membrana y tiene lugar a despolarizaciones entre los -30mV y -20mV. Las corrientes de entrada de Ca^{2+} a través de ellos son amplias y de larga duración, mientras que su inactivación es lenta, siendo además menos sensibles al mantenimiento de un potencial de membrana ligeramente despolarizado (Catterall, 2000).

Los canales VOC tipo-L presentan una mayor permeabilidad al Ba^{2+} que al Ca^{2+} , y farmacológicamente se caracterizan por su alta sensibilidad a las DHP, ya sean agonistas como el Bay K8644 o antagonistas como la nifedipina, lo que les confiere también el nombre de canales sensibles a las DHP. Además de su papel como vía principal de entrada de Ca^{2+} , los canales VOC tipo-L contribuyen al control y liberación

de hormonas y neurotransmisores en diferentes preparaciones endocrinas y neuronales (Tsien & Tsien, 1990). Estos canales participan en diversos procesos en los que la entrada de Ca^{2+} estimula la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes del RS, además de favorecer la contracción muscular a través del acoplamiento excitación-contracción y el tono miogénico (Amberg & Navedo, 2013),

La liberación de Ca^{2+} desde el RS puede ser mediada a través del inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP_3), a través de la activación de receptores de membrana por agonistas mediante la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) (Wu *et al.*, 1992; Berridge, 1993; Misárková *et al.*, 2016) o a través de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). En este proceso, la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L va a provocar un incremento local de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que va a activar los RyR, estimulando la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del RS (Collier *et al.*, 2000; Gyorke & Fill, 1993).

Sin embargo, se ha propuesto un nuevo papel de los canales VOC tipo-L como sensores metabotrópicos en las CMLV que actuarían como sensores de voltaje y activarían proteínas G asociadas a la ruta de la PLC e IP_3 . La entrada de Ca^{2+} extracelular se asocia generalmente a la activación de la subunidad Gq/11 de una proteína G heterotrimérica. Esta subunidad Gq/11 va a activar la fosfolipasa $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$), que escinde fosfatidilinosoles como el fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato (PIP_2) en IP_3 y diacilglicerol (DAG). El IP_3 es un mensajero que se une a receptores específicos de IP_3 (IP_3R) en el RS con la consecuente liberación de Ca^{2+} al citosol (Wu *et al.*, 1992; Berridge, 1993; Misárková *et al.*, 2016).

La amplificación de la señal de Ca^{2+} se consigue mediante la activación de los RyR, presentes en la membrana del RS. Tras la activación de estos receptores se va a producir más liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, provocando un aumento aún mayor de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y potenciando así la señal de Ca^{2+} que va a desembocar en el proceso de contracción de la pared vascular. Además, esta señal también puede amplificarse por agonistas como el ATP que modulan el proceso de CICR (Ureña *et al.*, 2007).

Revisión Bibliográfica

Por otro lado, la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L también es fundamental en el acoplamiento excitación-transcripción, pues influye en la expresión de genes tras la activación de factores de transcripción dependientes de Ca^{2+} (Misárková *et al.*, 2016).

La cantidad de canales VOC tipo-L en la superficie celular se encuentra estrechamente relacionada con el estado de diferenciación de las CMLV. De hecho, el número de canales disminuye a medida que aumenta la “desdiferenciación celular”, proceso por el cual se pasa desde un estado diferenciado de una célula con funciones especializadas hacia estados más indiferenciados (Gollasch *et al.* 1998).

El bloqueo de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) en las CMLV proliferativas incrementa el número de la subunidad $\alpha_1\text{C}$ de los canales VOC tipo-L, así como el total de canales VOC tipo-L funcionales (Ihara *et al.*, 2002).

La familia de la MAPK se encuentra implicada en procesos de crecimiento, migración y proliferación celular. El bloqueo *in vivo* de los canales VOC tipo-L en arterias mesentéricas de rata mediante transfección con ARN pequeño de interferencia (siRNA) incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal, pero reduce la contractilidad vascular y disminuye la expresión de genes que codifican proteínas contráctiles en las CMLV (Kudryavtseva *et al.*, 2014).

En ratas espontáneamente hipertensas (SHR), las cuales se caracterizan por tener una actividad del sistema nervioso simpático exacerbada (Pintérová *et al.*, 2011), el flujo de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L se encuentra incrementado, ya que el canal se encuentra regulado al alza (Pratt *et al.*, 2002). Esta regulación potenciada se encuentra asociada a una elevada presión arterial y a la despolarización de la membrana plasmática (Pesic *et al.*, 2004). Estudios recientes han mostrado que la entrada de Ca^{2+} incrementada junto a una disminución de la sensibilidad al Ca^{2+} son factores clave que marcan la hipertensión genética de las SHR (Behuliak *et al.*, 2013, 2015).

Revisión Bibliográfica

Es importante señalar que los canales VOC tipo-L en el MLV son activados por noradrenalina (NA) (Nelson *et al.*, 1988), lo que concuerda con el hecho de que la mayor parte de la vasoconstricción simpática, la cual se encuentra aumentada en las SHR, es sensible a la inhibición con el bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L nifedipina (Pintérová *et al.*, 2010).

A pesar del papel fundamental del sistema nervioso simpático sobre los canales VOC tipo-L en estados hipertensivos, las alteraciones en el receptor β -adrenérgico o en la vasodilatación dependiente de óxido nítrico (NO) pueden contribuir a un flujo de Ca^{2+} incrementado en las SHR, ya que los canales VOC tipo-L pueden cerrarse en presencia de altas concentraciones de nucleótidos cíclicos, tanto AMPc como GMPc (Ishikawa *et al.*, 1993).

Revisión Bibliográfica

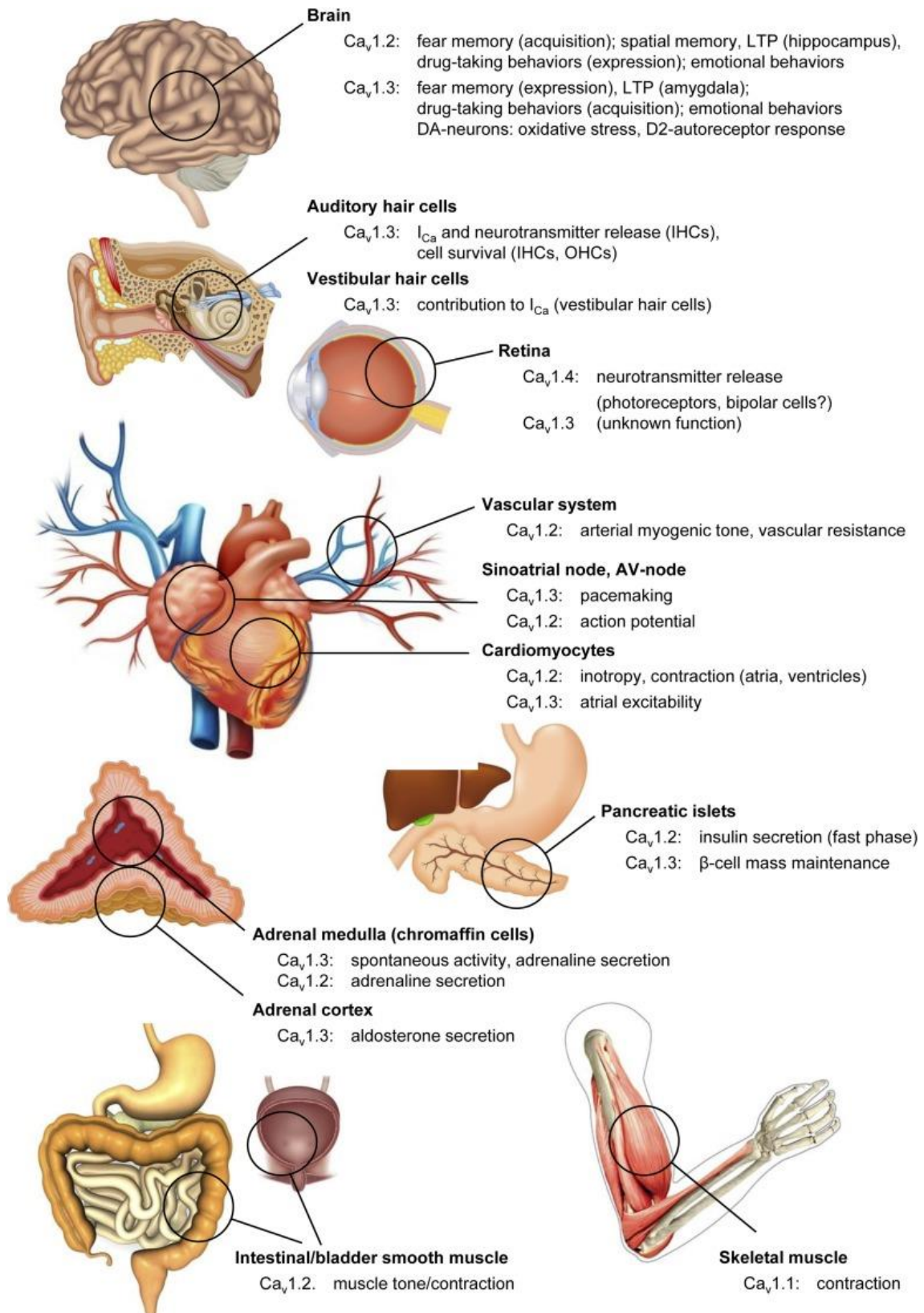


Figura I. Ubicación y funciones fisiológicas más importantes de las diferentes isoformas del canal VOC tipo-L (Zamponi *et al.*, 2015).

1.1.1.2. Estructura del canal VOC tipo-L

Este canal es un complejo de proteínas compuesto por una subunidad α_1 que forma el poro iónico y otras subunidades auxiliares que van a modular la actividad del canal, incluyendo una subunidad β intracelular y una subunidad δ de localización extracelular que se encuentra unida a la subunidad α_2 a través de puentes disulfuro, formando la comúnmente conocida como subunidad $\alpha_2\delta$ (Bezanilla, 2008; Savalli *et al.*, 2016).

La subunidad $\alpha_2\delta$ es una gran proteína de aproximadamente 170 kD mayormente extracelular, con un único segmento de anclaje a membrana (Davies *et al.*, 2010) que se une a la subunidad α_1 desde el dominio extracelular (Cassidy *et al.*, 2014). Las proteínas α_2 y δ proceden de la expresión de un mismo gen que va a dar lugar a una pre-proteína y mediante maduración post-transcripcional es proteolizada y posteriormente unida a través de puentes disulfuro para crear la subunidad $\alpha_2\delta$ madura (Calderón-Rivera *et al.*, 2012).

La subunidad α_1 está formada por cuatro dominios estructurales (I-IV), cada uno de los cuales posee seis segmentos transmembrana (S1-S6) unidos entre sí, y extremos terminales NH₂- y COOH- intracelulares.

El lazo intracelular entre los dominios I y II conforma el sitio de unión de la subunidad β , llamado dominio de interacción α (AID), mientras que el C terminal contiene una región IQ, llamada así porque contiene isoleucina y glutamina, a la que se une la CaM (Van Petegem *et al.*, 2005; Savalli *et al.*, 2016).

El sensor de voltaje (VSD) lo conforman las hélices de los dominios S1-S4, mientras que el poro iónico viene definido por los dominios S5 y S6 (Bezanilla, 2008; Savalli *et al.*, 2016). Dos residuos de glutamato en el bucle del poro van a determinar la selectividad de este canal para el ión Ca²⁺. Esta subunidad está codificada por cuatro genes diferentes que, mediante maduración post-transcripcional, dan lugar a diferentes variantes denominadas Ca_v1.2a y Ca_v1.2b (Bezanilla, 2008).

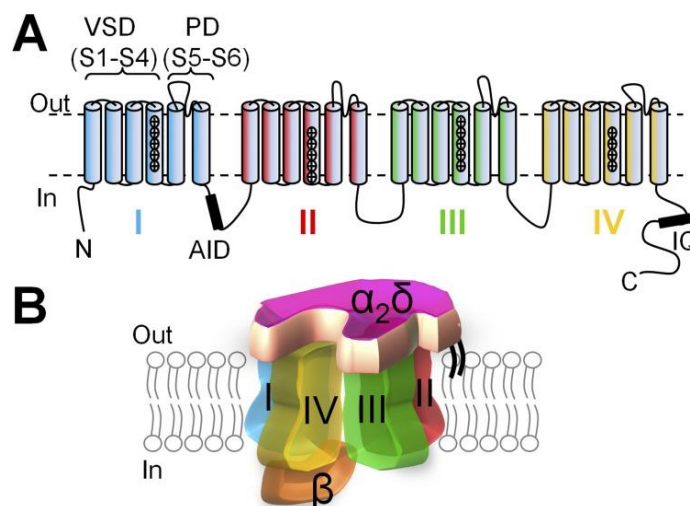


Figura II. Estructura y composición del canal $\text{Ca}_v1.2$ (Savalli *et al.*, 2016). (A) Subunidad α_1 con 4 dominios (I-IV) de 6 segmentos transmembrana cada uno (S1-S6). Sensor de voltaje (VSD) formado por las hélices S1-S4. Dominios S5-S6 que definen el dominio que forma el poro iónico (PD). (B) Estructura tridimensional del $\text{Ca}_v1.2$ en base a la estructura del canal $\text{Ca}_v1.1$ descrita a través del uso de criomicroscopía electrónica y en la que los dominios I-IV se disponen en el sentido de las agujas del reloj (Wu *et al.*, 2015).

1.1.1.3. Canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo T

Estos canales se activan a potenciales de membrana ligeramente hiperpolarizados (en torno a un voltaje umbral de -70mV) y se caracterizan por tener una activación rápida, una inactivación transitoria y una conductancia relativamente baja (Pérez-Reyes, 2003). Además, poseen cierta sensibilidad a bloqueantes de los canales VOC tipo-L como las DHP (Kopecky *et al.*, 2014).

La familia de los canales VOC tipo-T está formada por tres miembros: los $\text{Ca}_v3.1$, los $\text{Ca}_v3.2$ y los $\text{Ca}_v3.3$ (también conocidos como $\alpha_1\text{G}$, $\alpha_1\text{H}$ y $\alpha_1\text{I}$). Este tipo de canales se han encontrado en células en fase G_0 o G_1 del ciclo celular (Kuga *et al.*, 1996), lo que sugiere un posible papel de los mismos en procesos de proliferación celular. Sin embargo, diversos estudios los han implicado en procesos contráctiles del MLV dependientes del endotelio vascular (Boulanger *et al.*, 1994; Zhou & Wu, 2006).

Por ejemplo, se ha demostrado que dichos canales intervienen en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} y en la regulación de la contracción-relajación del músculo liso a nivel del cuerpo cavernoso humano, responsable de la erección/flacidez y del tono en el tejido eréctil (Zeng *et al.*, 2005).

1.1.2. Canales de cationes no selectivos

Los receptores de potencial transitorio (TRP) que se encuentran en la membrana de las CMLV forman canales catiónicos heterotetraméricos, los cuales van a permitir casi siempre el paso de iones Ca^{2+} . Esta familia de receptores está formada por canales presentes en la membrana que son activados tras la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} como los SOC, y por receptores como los ROC (Misárková *et al.*, 2016).

1.1.2.1. Canales de Ca^{2+} activados por receptor (ROC)

Los canales ROC están presentes en la membrana plasmática, se abren como resultado de la unión de un agonista a un receptor y no dependen de las variaciones en el potencial de membrana. Estos canales se encuentran en el músculo liso visceral y en el MLV, y pueden ser activados por una amplia variedad de agonistas, entre los que se encuentran la acetilcolina (Ach), NA, vasopresina, serotonina, angiotensina II (ATII), endotelina-1 (ET-1) e incluso el neuropéptido Y (Misárková *et al.*, 2016).

Para diferenciar estos canales de los SOC, se entiende que los ROC son canales de cationes tanto mono como divalentes, no selectivos, permeables al Ca^{2+} y cuya apertura depende de la unión de un agonista a un receptor. Sin embargo, los canales SOC van a abrirse en respuesta al vaciado de los depósitos intracelulares ya sea por acción de agonistas como la cafeína o a través de inhibidores de la bomba Ca^{2+} -ATPasa del RS (SERCA) como el ácido ciclopiazónico (CPA) o la tapsigargina (González de la Fuente *et al.*, 1995; Misárková *et al.*, 2016).

En el caso de que el receptor y el canal iónico se encuentren físicamente separados, existen diferentes rutas que provocan tanto la activación del receptor como la apertura del canal, en función del tipo de receptor, de la clase de tejido y de la especie animal en la que se encuentren.

Estos canales permiten el paso de iones según un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática, operan en potenciales de membrana en reposo (-60mV aproximadamente) y se inhiben por despolarización de la membrana (Komori & Bolton, 1990; Komori *et al.*, 1992).

En muchos casos el receptor está compuesto por siete dominios transmembrana y pertenece a la familia de los GPCR. La apertura de estos canales asociada a una vía de señalización acoplada a un receptor dependiente de proteína G se ha descrito en el músculo liso visceral y en el MLV (Komori & Bolton, 1990; Komori *et al.*, 1992).

Normalmente, las vías de señalización intracelular asociadas a proteínas G que activan los ROC son las del subgrupo Gi/Go en el músculo liso visceral y Gq en el MLV (Komori *et al.*, 1992; Macrez-Lepetre *et al.*, 1997). Se ha propuesto que la entrada de Ca²⁺ a través de los canales ROC podría afectar a las corrientes de cloro (Cl⁻) y a la activación de canales de potasio (K⁺) alterando el potencial de membrana y provocando de ese modo la consecuente activación de los canales VOC (Large, 2002).

Los canales ROC permeables al Ca²⁺ también pueden ser activados por ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico y por sus metabolitos. Además, otras vías de señalización, como las asociadas a la enzima diacilglicerol lipasa y a la fosfolipasa A2, también intervienen en la activación de estos canales (Meves, 1994).

1.1.2.2. Canales de Ca²⁺ operados por almacén (SOC)

El vaciamiento de los almacenes intracelulares de Ca²⁺ va a activar la entrada de Ca²⁺ extracelular a través de canales localizados en la membrana plasmática con el objetivo de rellenar los depósitos intracelulares. Esto es lo que se denomina entrada de Ca²⁺ operada por almacén (SOCE) y a este tipo de canales SOC (Parekh & Putney, 2005).

Es destacable el hecho de que la activación de los canales SOC se produce por la depleción del RS en sí misma y no por el Ca²⁺ que se libera desde los depósitos. Esto ocurre independientemente del tipo de estímulo a través del cual la depleción del RS tenga lugar, ya sea mediante la producción o no de IP₃ (González de la fuente *et al.*, 1995).

Este hecho se ha demostrado a través del uso de inhibidores de la bomba SERCA, como la tapsigargina y el CPA (González de la fuente *et al.*, 1995), ya que esta inhibición produce una depleción del RS de forma pasiva al no ser capaz la bomba Ca^{2+} -ATPasa de bombear el Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el interior del RS, activando a los SOC. Estos compuestos inhibidores permiten diferenciar entre las corrientes ROC y SOC, ya que, en el MLV muchos de los agonistas que activan canales ROC activan también a la PLC, estimulando la producción de IP_3 y provocando la liberación de Ca^{2+} del RS al unirse el IP_3 al IP_3R (Wu *et al.*, 1992; Berridge, 1993; Misárková *et al.*, 2016).

El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por la movilización de Ca^{2+} de los depósitos del RS va a producir la formación del complejo Ca^{2+} -CaM que va a inducir la activación de los SOC (Smani *et al.*, 2004).

Por otro lado, al producirse la depleción de los almacenes del RS, unas proteínas transmembrana denominadas moléculas de interacción del estroma 1 (STIM1) presentes en el RS y que actúan como sensores de Ca^{2+} , van a oligomerizarse y traslocarse hacia la membrana plasmática, favoreciendo su interacción con las proteínas Orai1. Las Orai1 son unas moléculas formadoras de poros que conforman un canal de cationes en la membrana plasmática que permite la entrada de Ca^{2+} extracelular (Wu *et al.*, 2006; Manjarrés *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2016).

Una vez que las proteínas STIM1 se acercan lo suficiente a Orai1, las STIM1 se unen al extremo amino terminal de Orai1, y esta unión permite la apertura o activación del canal Orai1 para que entre Ca^{2+} desde el medio extracelular al citosol (Manjarrés *et al.* 2010; Lin *et al.*, 2016; Figura III). Se ha observado que al reducirse la expresión de STIM1/Orai la activación de los canales SOC también disminuye (Potier *et al.* 2009).

Las células diferenciadas provocan la activación de los SOC preferentemente a través de los RyR localizados en la membrana del RS, mientras que las células indiferenciadas lo hacen a través de los IP_3R (Berra-Romani *et al.*, 2008). Esto se debe a que en CMLV proliferativas la expresión de los RyR es más baja que en las que tienen un fenotipo contráctil (Vallot *et al.*, 2000).

En los cultivos de CMLV se ha observado que al pasar de un fenotipo contráctil a uno proliferativo aumenta la expresión tanto de STIM1 como de Orai1 además de producirse un incremento en la actividad de los canales ROC (Berra-Romani *et al.* 2008, Potier *et al.* 2009), mientras que la expresión de los canales VOC tipo-L disminuye (Berra-Romani *et al.* 2008). Esto sugiere que estas proteínas juegan un papel importante en las alteraciones del metabolismo del Ca^{2+} que tienen lugar en los procesos de remodelado vascular, y que la entrada de Ca^{2+} en estas células se encuentra mayormente mediada por los canales ROC y SOC.

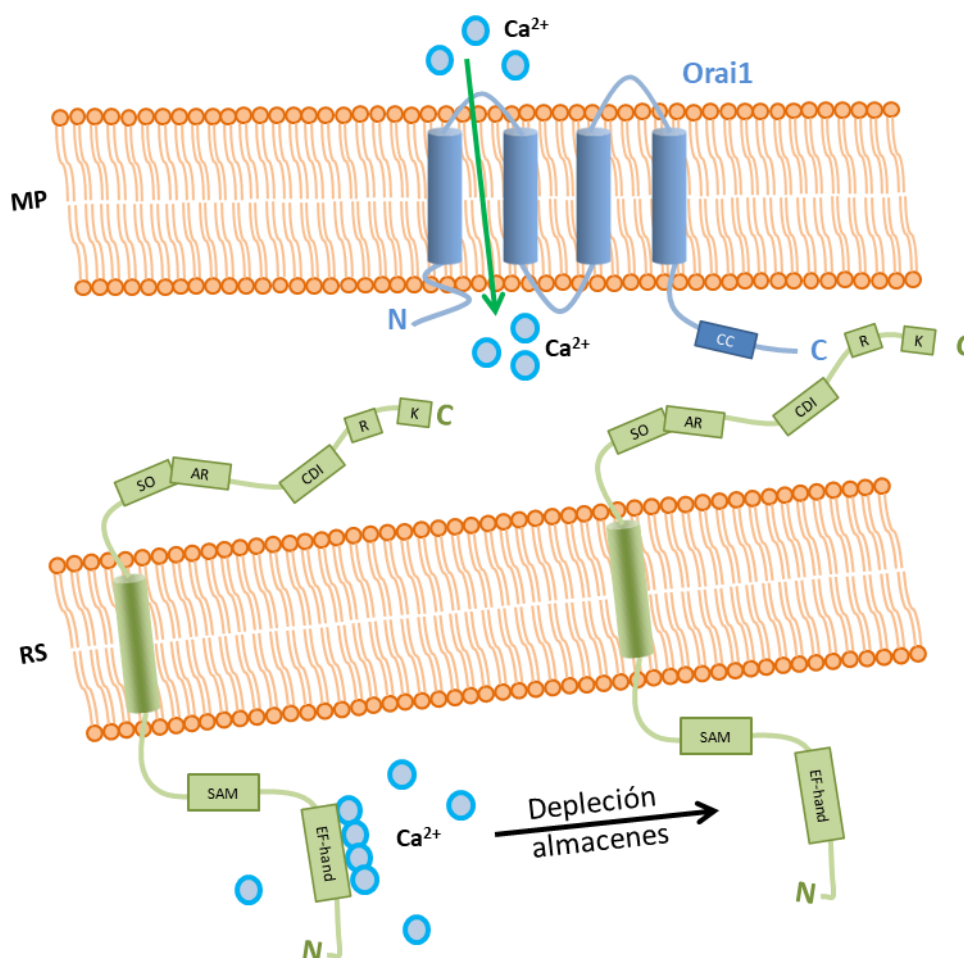


Figura III. Representación de la interacción STIM-Orai1. Al producirse la depleción de los almacenes de Ca^{2+} del RS, las proteínas sensoras STIM1 presentes en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) se aproximan a la membrana plasmática (MP) e interaccionan con las proteínas Orai1 que conforman el canal SOC, activándolo y permitiendo la entrada de Ca^{2+} para rellenar los depósitos intracelulares.

1.1.3. Canales de Ca^{2+} en la membrana del Retículo Sarcoplásmico y Ca^{2+} ATPasa

La liberación de Ca^{2+} a través de los canales que se encuentran en la membrana del RS en el MLV es esencial para el mantenimiento y control de la excitabilidad celular y reactividad vascular. Existen dos tipos principales de canales de Ca^{2+} en la membrana del RS: los RyR y los IP_3R . Estos receptores median el proceso de CICR desde el RS, el cual participa en la formación de “sparks” de Ca^{2+} (micro-liberaciones de Ca^{2+} desde el RS) así como en las ondas de Ca^{2+} (Berridge, 1997; Gyorke & Fill, 1993).

Una de las propiedades fundamentales de estos canales es la sensibilidad dual al Ca^{2+} que presentan. Por un lado, los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inician un “feedback” positivo a través de la apertura de canales adyacentes, potenciando así la liberación de Ca^{2+} del RS. Por otro lado, si la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se eleva por encima de ciertos niveles, tiene lugar un “feedback” negativo que va a dar lugar al cierre de estos canales, evitando de este modo el sobrellenado de los depósitos intracelulares (Bootman & Berridge, 1996).

Ambos tipos de canales, los RyR y IP_3R , pueden coexistir en una misma célula y tienen una gran homología de secuencia, lo que hace sospechar que podrían derivar de una proteína ancestral común, a pesar de que el mensajero que controla su activación es diferente (Berridge, 1993).

1.1.3.1. Receptor de rianodina (RyR)

Los receptores de RyR son canales de Ca^{2+} intracelulares que median la liberación de Ca^{2+} desde el RS hacia el citoplasma celular. Se han descrito hasta tres isoformas de este receptor (RyR1, RyR2 y RyR3) codificadas por tres genes diferentes (Lanner *et al.*, 2010), y deben su nombre a la gran afinidad que presentan por el alcaloide rianodina. La unión de la rianodina al RyR estabiliza un sub-estado parcialmente abierto del canal, que conduce al vaciamiento de los depósitos intracelulares del RS (Sorrentino *et al.*, 1993).

Revisión Bibliográfica

El RyR1 es el canal de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del músculo esquelético. En el músculo esquelético, la señal que libera el Ca^{2+} almacenado en los almacenes es la despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización es detectada por un receptor dihidropiridínico (DHPR) presente en la membrana de los túbulos T. El DHPR va a sufrir un cambio conformacional que se transmite físicamente al RyR1 presente en la membrana del RS, dando lugar a la apertura del canal y a la liberación del Ca^{2+} al sarcoplasma, lo que en consecuencia va a provocar la contracción muscular (Fleischer & Inui, 1989).

Por otro lado, en el músculo cardíaco, el canal de Ca^{2+} que se encuentra en los depósitos intracelulares es el RyR2. El canal RyR2 se abre por el aumento súbito de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ local. En este caso, una pequeña cantidad de Ca^{2+} que entra a través de los canales VOC presentes en la membrana plasmática es lo que provoca la apertura del canal RyR2 y la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} desde el RS, en el proceso conocido como CICR (Gyorke & Fill, 1993). Muchas células nerviosas también poseen RyR2 y se ha propuesto que el proceso de CICR también podría contribuir a amplificar los aumentos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ originados por activación de los canales VOC en las células nerviosas (Friel & Tsien, 1992).

También ha sido identificado el receptor RyR3, el cual se expresa en muchos tipos celulares y difiere de los otros RyRs en que no es sensible a la cafeína (Sorrentino *et al.*, 1993).

Se ha encontrado mRNA de transcripción, así como niveles de proteína de las tres isoformas en el MLV. Las isoformas RyR1 y RyR2 median las “*sparks*” de Ca^{2+} en el músculo liso de la vena porta (Coussin *et al.*, 2000), mientras que la isoforma RyR2 es la predominante en el MLV de arterias de resistencia en ratas (Vaithianathan *et al.*, 2010).

Diversos estudios han sugerido que, en contraste al acoplamiento entre los canales VOC tipo-L y los RyR en el músculo esquelético y cardíaco, podría existir un acoplamiento en el MLV en el cual los canales VOC tipo-L indirectamente modularían el RyR al contribuir a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ global y a la carga de Ca^{2+} del RS (Collier *et al.*, 2000).

En el MLV, el RyR puede ser activado por la cafeína, y en función de su concentración, inducir la liberación masiva de Ca^{2+} del RS o aumentar la frecuencia de las “*sparks*” de Ca^{2+} (Jaggar *et al.*, 2000). El RyR es inhibido de manera concentración-dependiente por el alcaloide rianodina. A bajas concentraciones, la rianodina puede activar el RyR mientras que a concentraciones elevadas lo inhibe. Este receptor juega un papel fundamental en el acoplamiento excitación-contracción tanto en músculo esquelético como en cardíaco ya que contribuye al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ necesaria para la contracción (Jaggar *et al.*, 2000). El RyR también influye de forma indirecta en la excitabilidad del MLV modulando la actividad de los canales iónicos de la membrana plasmática (Ghosh *et al.*, 2017).

En arterias de resistencia mesentéricas, las “*sparks*” de Ca^{2+} liberadas tras la activación del RyR van a activar los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (BK_{Ca}), provocando la apertura de estos canales y salida de K^+ de la célula en las llamadas corrientes STOC (corrientes de salida transitorias espontáneas) y dando lugar a la hiperpolarización y relajación del MLV (Nelson *et al.*, 1995).

Por otro lado, se ha descubierto que en la vena porta del conejo, los RyR producen despolarización a través de la apertura de canales de Cl^- sensibles al Ca^{2+} (Saleh & Greenwood, 2005). Esto demuestra el papel fundamental del RyR en la regulación de la excitabilidad del MLV en diferentes lechos vasculares. Además, el acoplamiento entre el RyR y el BK_{Ca} se encuentra afectado en modelos animales de diabetes (Nystoriak *et al.*, 2014), lo que resalta la importancia del acoplamiento entre estos receptores en el MLV cuya alteración conduce a disfunción vascular.

1.1.3.2. Receptor de inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP_3R)

El IP_3R es un canal de Ca^{2+} ubicuo que se encuentra en la membrana del RS y se encarga de liberar Ca^{2+} desde el RS hacia el citosol. Hasta la fecha se han identificado tres isoformas diferentes del IP_3R : $\text{IP}_3\text{R1}$, $\text{IP}_3\text{R2}$ e $\text{IP}_3\text{R3}$ (Narayanan *et al.*, 2012). A pesar de que las tres isoformas se han identificado en MLV de arterias aorta, mesentérica y cerebral, la isoforma $\text{IP}_3\text{R1}$ parece ser la predominante en el MLV de pequeñas arterias de resistencia (Zhou *et al.*, 2008). Estas isoformas difieren en la afinidad que presentan para unirse al IP_3 , y su localización física en la membrana

depende tanto de la isoforma como del tejido en el que se expresen (Tasker *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2008).

El IP₃R es activado por el segundo mensajero IP₃, resultado de la hidrólisis del PIP₂ en IP₃ y DAG por la acción de la PLC (Wu *et al.*, 1992). Se ha observado que en las CMLV desdiferenciadas se produce un incremento de la expresión de los IP₃R (Berra-Romani *et al.*, 2008), lo cual podría contribuir no solamente a un incremento de la [Ca²⁺]_i, sino a una amplificación de la activación de los SOC (Smani *et al.*, 2004), provocando un aumento aún mayor de la [Ca²⁺]_i. La activación de los IP₃R es fundamental en los procesos proliferativos de las CMLV (Wilkerson *et al.*, 2006). Además, es posible que una menor expresión de los RyR se encuentre relacionada con una expresión reducida de los canales VOC tipo-L en las CMLV desdiferenciadas (Gollasch *et al.*, 1998).

1.1.3.3. Ca-ATPasa del Retículo Sarcoplásmico (SERCA)

La SERCA es una proteína transmembrana con actividad ATPasa que se encuentra en la membrana del RS de las CMLV y cuya función es el transporte de iones Ca²⁺ desde el citosol hacia el interior del RS para mantener la homeostasis intracelular del Ca²⁺. Esto es de vital importancia ya que incluso pequeñas variaciones en la [Ca²⁺]_i pueden suponer importantes señales metabólicas que regulan y controlan una gran variedad de procesos fisiológicos, que van desde la proliferación celular hasta la contracción muscular e incluso la apoptosis (Berridge & Bootman, 1998).

Se han descrito tres variantes del gen SERCA: SERCA2a, SERCA2b y SERCA3, siendo SERCA2b la isoforma prevalente en el MLV (Lipskaia *et al.*, 2014).

La bomba SERCA se encuentra estrechamente relacionada con la entrada de Ca²⁺ capacitativa a través de los canales SOC en el MLV. La interacción STIM1-Orai (*ver apartado 1.1.2.2.*) va a dirigir el flujo de Ca²⁺ directamente al RS para que sea recaptado. Este Ca²⁺ es apenas indetectable en el citosol, aunque al usar inhibidores de la SERCA para activar los SOC se demuestra que ese flujo de Ca²⁺ pasa por el citosol, ya que aumenta la [Ca²⁺]_i porque la bomba SERCA no es capaz de recaptar todo ese flujo de Ca²⁺ procedente de los SOC (Jousset *et al.* 2007).

Revisión Bibliográfica

La actividad de la bomba SERCA es mayor en las CMLV que en las células endoteliales, ya que el uso de CPA produce un menor incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células endoteliales que en las CMLV. Esto se debe a que la isoforma que expresan las células endoteliales es la SERCA3, cuya afinidad por el Ca^{2+} es menor que la isoforma SERCA2b del MLV (Szewczyk *et al.*, 2007).

Las funciones de las CMLV pueden verse modificadas por alteraciones en la regulación de la SERCA. En células con fenotipo proliferativo la expresión de la SERCA se encuentra regulada a la baja (Lipskaia *et al.*, 2005). Tal es la importancia de esta proteína en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ que, si la SERCA y el RyR no se encuentran presentes en el RS, las CMLV pierden la capacidad de contraerse (Vallot *et al.*, 2000).

Es interesante destacar que los procesos de migración y proliferación celular se encuentran incrementados en las CMLV de origen diabético (Faries *et al.*, 2001), mientras que la actividad contráctil está disminuida (Pfaffman *et al.*, 1982). Esto probablemente se debe a una reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ como consecuencia de la alteración de la actividad de la SERCA, los IP_3R y los RyR (Searls *et al.*, 2010).

Por lo tanto, un desequilibrio en la actividad de estas proteínas encargadas de regular la $[Ca^{2+}]_i$ puede conducir a alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular.

2. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCIÓN EN EL MLV

En las CMLV que presentan un fenotipo contráctil tienen lugar cambios transitorios en la $[Ca^{2+}]_i$ mientras que la $[Ca^{2+}]_i$ en reposo es baja. Esto se debe principalmente a dos factores en las vías de señalización de Ca^{2+} . Por un lado, se encuentra la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L y por otro la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Misárková *et al.*, 2016).

La estimulación de las células contráctiles del MLV por acción de agonistas vasoconstrictores tales como la ATII o la ET-1 conlleva la posterior fosforilación de la subunidad reguladora MLC_{20} , la cual incrementa su actividad ATPasa. Esto a su vez va a desembocar en un incremento de la contracción vascular (Somlyo and Somlyo, 2003).

La regulación de la MLC corre a cargo de dos importantes proteínas: la MLCK y la MLCP, las cuales van a actuar mediante procesos de fosforilación/desfosforilación respectivamente. Por lo tanto, la MLC puede encontrarse fosforilada y activa debido a la activación de la MLCK vía Ca^{2+} -CaM o a la inhibición de la MLCP a través de las rutas de la PKC/CPI-17 y/o RhoA/RhoK (Rho cinasa) (Somlyo *et al.*, 1999; Misárková *et al.*, 2016).

Diferentes agentes vasoconstrictores como la ET-1 o la ATII actúan a través de GPCR. La estimulación de dicho receptor por los agonistas va a producir la activación de proteínas G heterotriméricas que a su vez van a producir una cascada de señalización que desemboca en la contracción del MLV. Las proteínas G heterotriméricas tienen tres tipos diferentes de subunidad α : Gq/11, Gi y G12/13, lo que les confiere una gran diversidad funcional (Misárková *et al.* 2016).

La vía de señalización de la subunidad Gq/11 está comúnmente asociada a la señalización del Ca^{2+} , mientras que la ruta de la G12/13 se encuentra implicada en los procesos de sensibilización al Ca^{2+} . La subunidad Gq/11 activa la $PLC\beta$, la cual escinde el PIP_2 en DAG e IP_3 . Éste último se une a los IP_3R del RS, provocando una movilización del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y en consecuencia suscita un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Wu *et al.*, 1992; Berridge, 1993; Misárková *et al.*, 2016). Este incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ va a dar lugar a varios eventos intracelulares.

Revisión Bibliográfica

Por un lado, el Ca^{2+} del citosol va a unirse a la proteína CaM, que tiene cuatro sitios de unión para el Ca^{2+} , formando así el complejo Ca^{2+} -CaM, que va a activar la MLCK (Wu *et al.*, 1992). La fosforilación de la MLCK es lo que va a causar la contracción del MLV. La CaM también es responsable de activar los SOC para reponer los niveles de Ca^{2+} de los depósitos agotados del RS (Smani *et al.*, 2004; Misárková *et al.*, 2016). Además de los SOC, también activan los canales BK_{Ca} , provocando la hiperpolarización de la membrana y el cierre de los canales VOC tipo-L (Nelson *et al.*, 1995).

Por otro lado, el DAG activa los canales ROC y la proteína cinasa C (PKC), la que podría activar también los ROC, permitiendo, además de la entrada de Ca^{2+} , la entrada de cationes Na^+ al interior celular. Esto provoca a su vez la despolarización de la membrana plasmática, la cual va a inducir la apertura de los canales VOC tipo-L que se encuentran en la misma y permitiendo así una mayor entrada de Ca^{2+} al citosol (Albert & Large, 2002).

Tras el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólicos existen mecanismos para regular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ya sea mediante bombas de Ca^{2+} con actividad ATPasa como la SERCA presente en el RS y la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática, o a través de transportadores iónicos como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Misárková *et al.* 2016). Todos estos mecanismos disminuyen los niveles de Ca^{2+} intracelular, modulando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y manteniendo así un equilibrio entre la entrada de Ca^{2+} al citosol y su retirada (Berra-Romani *et al.* 2008). En la membrana del RS van a actuar también los RyR, que se activan tras una gran elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La activación de los RyR produce la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} del RS, activando consecuentemente la bomba SERCA para restaurar los niveles de Ca^{2+} de los depósitos transfiriendo Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del RS (Misárková *et al.* 2016).

La activación de la subunidad G_i tras la estimulación de los GPCR va a desembocar en contracción mediante la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC). En condiciones normales, el AMPc activa la proteína cinasa A (PKA), la cual desensibiliza la MLCK.

La subunidad G12/13 activa el factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), el cual separa el GDP de la proteína GTPasa RhoA, permitiendo la unión del GTP al sitio en el que se encontraba unido el GDP.

El complejo RhoA-GTP va entonces a activar la RhoK, que a su vez va a fosforilar e inactivar la MLCP. Además, la RhoK también va a fosforilar la proteína inhibidora de la MLCP específica del músculo liso (CPI-17), cuya forma fosforilada se va a unir a la subunidad catalítica de la MLCP, inhibiéndola y favoreciendo así el proceso de contracción al mantener la MLC en su forma fosforilada y activa (Misárková *et al.*, 2016).

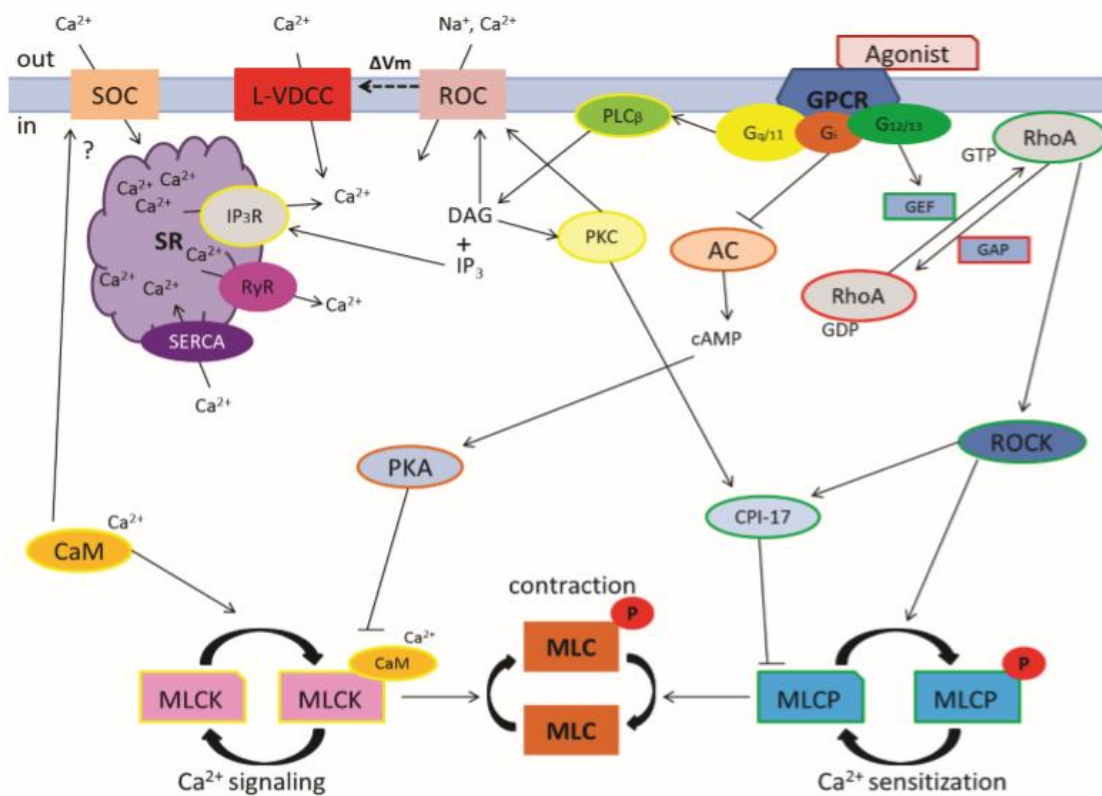


Figura IV. Representación de las vías de señalización intracelular a través de las cuales se produce el acoplamiento excitación-contracción en el MLV (Misárková *et al.*, 2016).

2.1. Mecanismos de entrada y movilización de Ca^{2+} en el MLV

Los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el MLV pueden producirse por la entrada de un flujo de Ca^{2+} desde el exterior, por la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares o por una combinación de ambos mecanismos. La contribución de cada uno al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ varía en función de qué receptores se activen. Este sistema es bastante complejo y existe para regular adecuadamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De este modo se logra mantener una correcta función fisiológica del MLV, ya que pequeños cambios en la localización, duración o amplitud del flujo de Ca^{2+} son suficientes para provocar una amplia variedad de respuestas fisiológicas (Bootman *et al.*, 2001).

2.1.1. Liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS)

La principal y más importante fuente de almacenamiento intracelular de Ca^{2+} es el retículo endoplasmático, denominado RS en el caso de células musculares (Leung *et al.*, 2008). En la membrana del RS se encuentran dos importantes receptores que median la liberación del Ca^{2+} al citosol: el IP_3R y el RyR (*ver apartado 1.1.3*).

Tras la escisión del PIP_2 en IP_3 y DAG por la $\text{PLC}\beta$ (Morello *et al.*, 2009), el IP_3 activa los IP_3R , que al abrirse van a provocar la salida de Ca^{2+} del RS hacia el citosol (Sureshan *et al.*, 2009), mientras que el DAG va a activar la PKC, la cual va a ejercer un efecto inhibitorio sobre la producción de más IP_3 por parte de la $\text{PLC}\beta$ (Rebecchi & Pentylala, 2000). La PKC también va a fosforilar directamente a los VOC, lo que puede afectar al flujo de Ca^{2+} (Pollock *et al.* 1995).

Por otro lado, la activación de los RyR por los incrementos locales de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produce una liberación adicional de Ca^{2+} desde el RS, amplificando así la señal de éste (del Valle-Rodriguez *et al.* 2003). Además de estar involucrados en el incremento de la señal de Ca^{2+} , los RyR participan en la terminación del flujo de Ca^{2+} a lo largo de la membrana plasmática, al activar los canales BK_{Ca} mediante la liberación de “sparks” de Ca^{2+} y producir la hiperpolarización de la membrana plasmática, cerrando así los canales VOC (Bolton, 2006). Por tanto, los RyR amplifican la señal de Ca^{2+} rápidamente pero también limitan y regulan el flujo de Ca^{2+} dependiente de voltaje.

Ambos receptores, los IP₃R y los RyR, activan vías de señalización que regulan eficazmente la movilización de Ca²⁺ del RS, además de regular la entrada de Ca²⁺ voltaje dependiente tanto espacial como temporalmente. Esto permite mantener la [Ca²⁺]_i controlada de una forma precisa y producir una rápida liberación de Ca²⁺ en respuesta a un estímulo (Tykocki & Watts, 2010).

2.1.2. Entrada de Ca²⁺ extracelular en el MLV

Normalmente, el Ca²⁺ entra en la célula a través de canales de Ca²⁺ presentes en la membrana plasmática (ver *apartado 1.1.1*) que se van a abrir en respuesta a uno o varios estímulos, como pueden ser la despolarización de membrana, la unión de un ligando a un receptor o la movilización de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares (Wray *et al.*, 2005).

La concentración de Ca²⁺ presente en el fluido extracelular es mucho mayor que la que se encuentra en el interior celular (2.5 mM vs 100 nM, respectivamente) (Guerini, 1998). Este hecho es fundamental, ya que el gradiente de concentración de Ca²⁺ que existe entre el interior y el exterior celular va a permitir que los cationes Ca²⁺ pasen a través de los canales hacia la célula mediante difusión pasiva.

2.2. Mecanismos de sensibilización al Ca²⁺

El proceso a través del cual la respuesta contráctil tiene lugar sin un incremento proporcional de la [Ca²⁺]_i se denomina sensibilización al Ca²⁺. El mecanismo de sensibilización al Ca²⁺ se basa en la inhibición de la MLCP, y existen dos circunstancias sobre su inhibición que van a provocar la sensibilización al Ca²⁺: la fosforilación de la subunidad reguladora de la MLCP (MYPT1) y la fosforilación de la proteína inhibidora de MLCP específica del músculo liso vascular CPI-17. La forma fosforilada de la CPI-17 va a actuar uniéndose a la MLCP y provocando su inhibición (Eto *et al.*, 2004).

La proteína responsable de la fosforilación de MYPT1 y CPI-17 es la RhoK (Feng *et al.*, 1999; Kureishi *et al.*, 1997), aunque la CPI-17 es altamente regulada por la PKC de igual modo (Dimopoulos *et al.*, 2007). El efecto inhibitor que produce la RhoK sobre la MLCP se ve contrarrestado por la activación de la MLCP a través de la acción del GMPc (Bolz *et al.*, 2003).

Aparte de la inhibición de la MLCP, la RhoK también participa en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ de manera independiente a los canales VOC tipo-L y de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} . Al parecer esta regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ tiene lugar a través de la modulación de los canales ROC (Kureishi *et al.*, 1997; Ghisdal *et al.*, 2003; Villalba *et al.*, 2008).

La señalización del Ca^{2+} en las CMLV normalmente se encuentra asociada a la activación de la subunidad Gq/11 de las proteínas G heterotriméricas (Wu *et al.*, 1992), mientras que la activación de la GTPasa y la sensibilización al Ca^{2+} se atribuyen a la estimulación de la subunidad G12/13 (Suzuki *et al.*, 2003).

Algunos agentes vasoconstrictores como la ET-1 o la ATII estimulan tanto los receptores acoplados a Gq/11 como los G12/13 (Gohla *et al.*, 2000) mientras que la NA estimula los receptores α_1 - y α_2 -adrenérgicos acoplados a proteínas Gq/11 y G_i (Docherty, 1998). Esto sugiere que existe una conexión entre las vías de señalización del Ca^{2+} y los procesos de sensibilización al Ca^{2+} .

La fosforilación de la MLC es necesaria, además de para el proceso de contracción de las CMLV, para la migración y la citocinesis de células no musculares (Fukata *et al.*, 2001). Se ha descubierto que en las CMLV de aorta en cultivos celulares se produce una disminución de la expresión de algunas proteínas específicas del fenotipo contráctil (tales como la α -actina, la cadena pesada de miosina o la h1-calponina), mientras que la expresión de otras proteínas se encuentra aumentada (RhoA, RhoK y MYPT1) (Woodsome *et al.*, 2006). Todo esto apoya lo que indican estudios que sostienen que la proteína RhoK tiene un papel importante en procesos asociados a la proliferación de células del MLV desdiferenciadas (Yamakawa *et al.*, 2000).

Una disminución de la expresión en la CPI-17 podría ser la causa de una reducción de la sensibilización al Ca^{2+} en SHR, a pesar de que una fosforilación exacerbada de la CPI-17 podría contrarrestar hasta cierto punto las implicaciones funcionales de esta alteración en la vía de señalización de la RhoA/RhoK (Behuliak *et al.*, 2015).

3. ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-TRANSCRIPCIÓN EN EL MLV

El paso de un fenotipo contráctil a un fenotipo proliferativo se encuentra asociado a cambios en la expresión de genes que codifican transportadores, canales iónicos, proteínas contráctiles y receptores (Matchkov *et al.*, 2012).

En las CMLV se van a activar diferentes factores de transcripción en función de estímulos específicos y según las condiciones tanto extracelulares como intracelulares en las que se encuentren dichas células. Por lo tanto, en diferentes condiciones un mismo agonista puede activar diferentes factores de transcripción, así como diferentes agonistas pueden activar la misma vía de transcripción (Misárková *et al.*, 2016).

Estos cambios que se producen en las CMLV como consecuencia de la expresión de diferentes genes van a dar lugar a alteraciones en las vías de señalización del Ca^{2+} y en los mecanismos a través de los cuales tiene lugar la contracción vascular (Vallot *et al.*, 2000).

El proceso de acoplamiento excitación-transcripción en las CMLV es dependiente de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En las CMLV con un fenotipo diferenciado, los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ son mayores, de corta duración y más locales, mientras que en las CMLV con fenotipo proliferativo estos cambios son más pequeños, lentos y duraderos. Esta diferencia en la señalización del Ca^{2+} intracelular va a influir en la activación de unos determinados factores de transcripción y en la expresión de genes para un fenotipo (Lipskaia and Lompre 2004, Berra-Romani *et al.* 2008).

La transcripción de la mayor parte de los genes relacionados con un fenotipo diferenciado (como la α -actina, la cadena pesada de miosina o la calponina) depende de al menos un elemento CArG que se encuentra en el promotor génico. El elemento CArG está formado por 10 pares de bases con una secuencia a la cual se une el factor de respuesta al suero (SRF) (Miano, 2003). Uno de los genes característicos que participan en los procesos de proliferación y diferenciación celular es c-Fos. El promotor de este gen contiene el elemento CArG, región a la cual se une la proteína SRF (Treisman, 1992).

Revisión Bibliográfica

Han *et al.* (2006) han descrito que el SRF se encuentra involucrado en la expresión de la MLCK y en la fosforilación de la MLC a través de la cascada de señalización de la MAPK en el MLV, ruta de señalización cuya actividad se encuentra aumentada en las SHR (Kubo *et al.*, 2002).

La estimulación de los GPCR por agentes vasoconstrictores como la NA, la ET-1 o la ATII, va a desencadenar una cascada de señalización que desemboca en la transcripción de diversos genes (Misárková *et al.*, 2016). La proteína RhoK juega un papel fundamental en esta vía ya que es la encargada de fosforilar la proteína CPI-17, la cual se va a unir a la subunidad catalítica de la MLCP, inhibiéndola y eliminando de este modo la inhibición que ejerce la MLCP sobre el factor potenciador específico de miocito 2 (MEF2).

Al no encontrarse reprimido, este factor se va a traslocar al núcleo celular donde va a activar la transcripción de la proteína miocardina, potente coactivador del SRF (Wamhoff *et al.* 2004). Además, la expresión de la proteína miocardina también aumenta tras la despolarización de la membrana plasmática y la entrada de Ca^{2+} extracelular. Esto es característico de las CMLV diferenciadas, ya que la miocardina va a estimular la expresión de genes dependientes de CARG típicos del fenotipo diferenciado (Wamhoff *et al.* 2004).

Tras el aumento la expresión de miocardina y como consecuencia de la acción de la RhoK, tanto la miocardina como los factores de transcripción relacionados con miocardina (MRTF) se traslocan al núcleo (Miralles *et al.* 2003), y una vez allí se van a unir al SRF provocando la transcripción de genes característicos del fenotipo diferenciado de las CMLV (Pipes *et al.* 2006).

Al producirse un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como consecuencia de la estimulación de los IP_3R y los canales VOC tipo-L, se va a provocar la activación de la CaM, la cual activa a su vez la calcineurina (CN) (Misárková *et al.*, 2016). La CN desfosforila el factor nuclear de las células T activadas (NFAT), el cual es un factor de transcripción dependiente de Ca^{2+} que se expresa de forma permanente en las CMLV, específicamente la isoforma NFAT4 en el MLV. Este factor al ser desfosforilado por la CN se va a traslocar al núcleo para activar genes de proliferación (Misárková *et al.*,

2016). Además, NFAT4 también modula la excitabilidad de las CMLV a través de la regulación a la baja de la expresión de los canales de K^+ $K_v2.1$ (Amberg *et al.*, 2004).

Por otro lado, el factor de transcripción CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP) puede ser diana de varias cinasas que lo fosforilan, entre ellas la MAPK o la PKA. El tipo de cinasa que lo fosforila determina un efecto determinado en su actividad, y su activación depende de la formación del complejo Ca^{2+} -CaM (Sun *et al.* 1994). Este factor de transcripción es un regulador de los procesos de migración y proliferación de las CMLV (Klemm *et al.*, 2001).

Una vez activado, CREB se une a la región CRE del promotor regulando la transcripción de genes tanto en CMLV proliferativas (Cartin *et al.* 2000) como diferenciadas (Najwer & Lilly, 2005). CREB y SRF (el cual se une a la región CaRG) van a activar la transcripción de los genes c-Fos y c-Jun (Treisman 1992; Miano 2003).

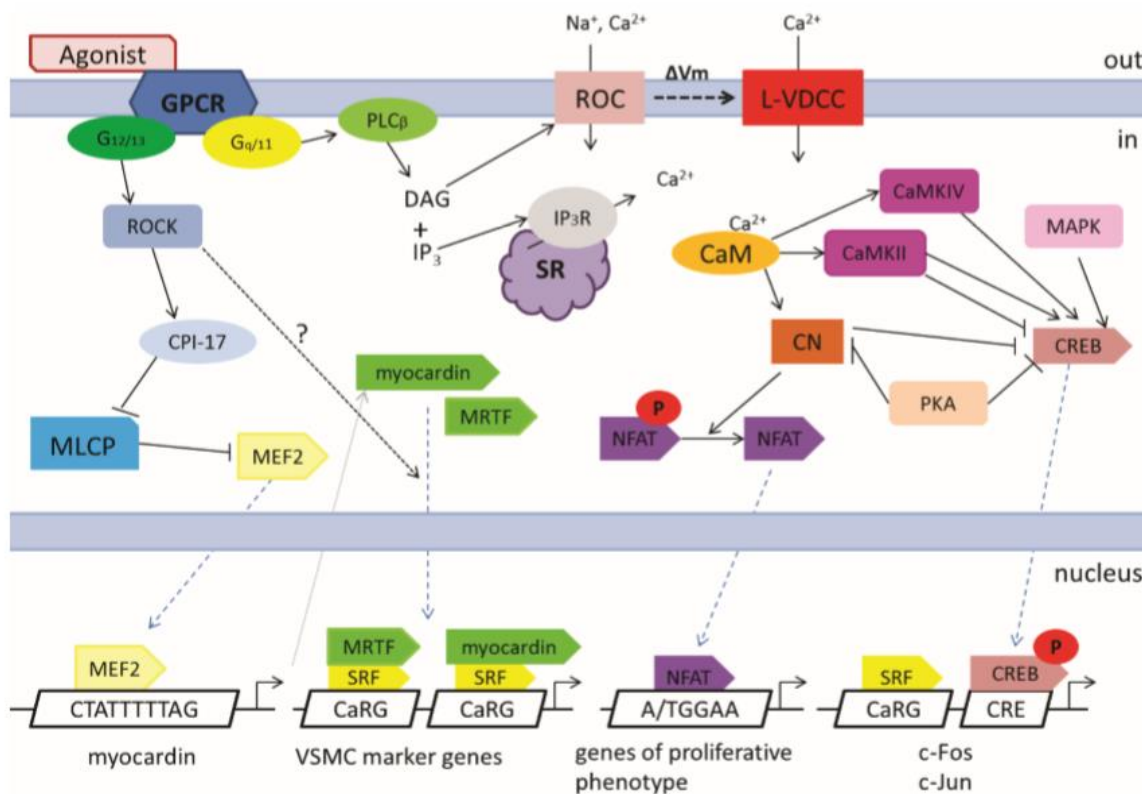


Figura V. Representación de las vías de señalización intracelular que conforman el acoplamiento excitación-transcripción en el MLV (Misárková *et al.*, 2016).

4. VÍAS INTRACELULARES DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADAS A RECEPTOR EN EL MLV

4.1. Receptores adrenérgicos

La familia de los receptores adrenérgicos (o adrenoceptores, -AR) se compone de siete receptores transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas. Dentro de esta familia, los adrenoceptores se han clasificado en dos clases principales, α y β , de acuerdo a criterios farmacológicos, aunque recientemente se han descubierto genes que codifican diferentes subtipos (Kobilka, Dixon *et al.*, 1987; Frielle *et al.*, 1987; Kobilka, Matsui *et al.*, 1987; Terman, 1990).

Las dos clases de adrenoceptores se subdividen en los subtipos α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - y β_3 -. Los subtipos α_1 - a su vez se subdividen en α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} y los α_2 - en α_{2A} -, α_{2B} -, α_{2C} -, α_{2D} - (Woodcock, 2007).

En condiciones fisiológicas, el corazón actúa sobre todo a través de los β -AR, cuyas vías de señalización van a provocar el incremento de la fuerza de contracción y la frecuencia cardiaca, además de poder influir en el tamaño del corazón a través de la hipertrofia cardiaca a largo plazo. Los cardiomiocitos expresan α_1 -AR, pero no α_2 -AR, y aunque los α_1 -AR no son considerados principales reguladores de la función cardiaca en condiciones fisiológicas, pueden ejercer un importante efecto sobre ella en algunas patologías (Rockman *et al.*, 2002).

Por otro lado, se han encontrado los tres subtipos del α_1 -AR en las diferentes capas musculares de arterias del músculo liso, tanto en grandes arterias como en pequeñas, además de estar presentes en células endoteliales y en diversas células de la capa adventicia. El hecho de que exista una gran heterogeneidad de tipos celulares que expresan este receptor sugiere un gran potencial de diferentes respuestas fisiológicas a catecolaminas o agonistas adrenérgicos (McGrath, 2015).

Mientras que el subtipo α_{1B} -AR es el predominante en roedores, el α_{1A} -AR es el principal subtipo expresado en el corazón humano (Hawrylyshyn *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 1999). Ambos subtipos actúan a través de la PLC- β vía activación de receptores acoplados a proteína G_q , favoreciendo la formación de IP_3 (Rybin *et al.*, 1996) y DAG,

lo que al final va a provocar la liberación de Ca^{2+} del RS y la activación de la vía de la PKC (Rebecchi & Pentylala, 2000).

4.2. Receptores de endotelina

De las tres isoformas de endotelina (ET) que han sido identificadas, ET-1, ET-2 y ET-3 (Inoue *et al.*, 1989), la ET-1 es la isoforma con mayor importancia en el sistema cardiovascular humano (Marasciulo *et al.*, 2006). La ET-1 juega un papel importante en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos como la hipertensión, el remodelado vascular, la hipertrofia cardíaca y la enfermedad coronaria (Schneider *et al.*, 2007).

A pesar de que varios tipos celulares son capaces de producir ET-1, la fuente predominante de su síntesis son las células del endotelio vascular (O'Brien *et al.*, 1987). La ET-1 es un potente péptido vasoactivo de 21 aminoácidos que provoca vasoconstricción y proliferación en las CMLV a través de la activación de dos tipos de GPCR, el receptor de endotelina A (ET_A) y el receptor de endotelina B (ET_B) (Tykocki & Watts, 2010).

Los receptores ET_A son los que se encuentran en las CMLV y median procesos de vasoconstricción, mientras que los ET_B son los que predominan en células endoteliales vasculares y median procesos de vasodilatación transitoria *in vivo* (Masaki, 2004). Estos receptores activan proteínas Gq/11 y G12/13, lo que va a provocar los efectos contráctiles y proliferativos que se le atribuyen a través de diversas moléculas como la PLC, el Ca^{2+} intracelular, la PKC y las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2). Por otro lado, los receptores ET_B estimulan proteínas Gi y Gq/11 en las CMLV y en las células endoteliales.

La ET-1 es un agonista no selectivo para estos receptores, y activa los dos de igual manera, lo que podría provocar interacciones y entrecruzamientos entre las diferentes vías de señalización de cada receptor (Gohla *et al.*, 2000; Cramer *et al.*, 2001; Masaki, 2004; Schneider *et al.*, 2007).

La disfunción del sistema de ET está presente en el dolor crónico, el asma, el derrame cerebral e incluso en la insuficiencia renal aguda, aunque la alteración del sistema ET aparece sobre todo en enfermedades vasculares como la hipertensión

(Ortega-Mateo & de Artiñano, 1997; Fagan *et al.*, 2001; Khodorova *et al.*, 2009). El bloqueo de los receptores ET_A incrementa el flujo y la perfusión sanguínea, además de ser capaz de reducir los depósitos de grasa y la disfunción en arterias coronarias. Debido a estos efectos, los agentes farmacológicos que disminuyen la actividad de las vías acopladas al receptor ET_A son candidatos para la prevención y tratamiento de la enfermedad coronaria (Nguyen *et al.* 2010; Thorin & Webb. 2010).

Se ha demostrado que las respuestas de un tejido a la ET-1 se alteran debido a una disfunción de la señalización del receptor y no a una activación de las vías de señalización mediadas por ET de forma concentración-dependiente (Elijovich *et al.*, 2001). La gran mayoría de las respuestas a la ET-1 son Ca²⁺-dependientes. La manera en la que los receptores de ET van a producir un incremento de la [Ca²⁺]_i va a depender del tejido, del tipo de receptor y de las vías de señalización que se activen (Jouneaux *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2009). Este incremento de la [Ca²⁺]_i puede deberse a un flujo de Ca²⁺ a través de los VOC, a la entrada de Ca²⁺ a través de canales independientes de voltaje, a la entrada SOCE, a la movilización de Ca²⁺ desde los almacenes intracelulares o a una combinación de cualquiera de estos mecanismos (Pollock *et al.*, 1995; Neylon, 1999; Kawanabe *et al.*, 2005).

En algunas células, los incrementos en la [Ca²⁺]_i son transitorios mientras que en otras, la ET-1 produce un incremento lento y prolongado de la [Ca²⁺]_i. Pequeños cambios en estas corrientes de Ca²⁺ pueden provocar importantes alteraciones en vías de señalización que pueden desembocar en la patogénesis de enfermedades vasculares como la hipertensión (Tykocki & Watts, 2010).

Se ha demostrado que los VOC se encuentran implicados en la entrada de Ca²⁺ inducida por ET-1, siendo la participación relativa de cada uno de ellos dependiente del tipo celular y de la especie en la que se estudie (Bkaily *et al.*, 1995; Betts *et al.*, 2000). Aunque se ha propuesto que podría existir una regulación directa de la ET-1 sobre los VOC, se sabe que la ET-1 regula el flujo de Ca²⁺ de forma indirecta a través de los VOC mediante segundos mensajeros como la PLC y la PKC (Van Renterghem *et al.*, 1988; Inoue *et al.*, 1990).

La despolarización de la membrana mediada por la activación del receptor de ET y la producción de las consecuentes corrientes de Ca^{2+} a través de los canales VOC es un importante mecanismo por el cual la ET-1 puede provocar un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Lovenberg & Miller, 1990; Hukovic & Hadziselimovic, 1998). Sin embargo, la inhibición de los canales VOC no elimina las corrientes de Ca^{2+} inducidas por la ET-1 (Gardner *et al.*, 1992), por lo que el restante flujo de Ca^{2+} inducido por ET-1 tiene lugar a través de canales de Ca^{2+} independientes de voltaje como los canales SOC o los ROC (Putney, 2009).

Los receptores de ET provocan la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares vía activación de la PKC e incrementando la producción de IP_3 (Neylon, 1999). De forma similar a los efectos de la ET-1 sobre los flujos de Ca^{2+} , el Ca^{2+} liberado desde el RS tras la activación de los IP_3R no es responsable en su totalidad del incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Pollock *et al.*, 1995), sino que parte de esa $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debe provenir de otros almacenes que la ET-1 puede movilizar, como los depósitos sensibles a rianodina u otros almacenes atípicos como los depósitos de Ca^{2+} lisosomales o mitocondriales (Poburko *et al.*, 2009). Aunque diversos estudios confirman que la ET-1 causa movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, ninguno proporciona evidencias de que los ET_A y los ET_B movilizan diferentes almacenes de Ca^{2+} . Los depósitos desde los que se produce la movilización inducida por ET-1 dependen del tipo celular y no del subtipo de receptor de ET (Tykocki & Watts, 2010).

5. PAPEL DE LAS PROTEÍN CINASAS EN LA SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADA A RECEPTOR

5.1. Fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3Ks)

Las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3Ks) son una familia de enzimas que se expresan de forma ubicua, se estudian en función de su estructura y del modo en que se activan. La PI3K se clasifica en tres grupos: clase I, clase II y clase III (Morello *et al.*, 2009). Esta enzima está compuesta por dos subunidades, la p110 o subunidad catalítica y la p85 o subunidad reguladora. La subunidad reguladora es la que está en contacto con la membrana de celular y la que va a fosforilar lípidos de membrana como el PIP₂, transformándolo en fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP₃). Posteriormente el PIP₃ es hidrolizado por la PLC en IP₃ y DAG, el cual va a provocar la fosforilación de la PKC (Morello *et al.*, 2009).

La PI3K clase I es la más extendida en las células del endotelio vascular y se clasifica en cuatro subtipos en función de la subunidad p110: α , β , γ y δ . Asimismo se han descrito tres subunidades de la p85 o reguladora: α , β y γ . La PI3K clase II se subdivide a su vez en: C2 α , C2 β y C2 γ .

En último lugar se encuentra la PI3K clase III que presenta una única subunidad catalítica p110 denominada Vps34. La función de esta forma parece ser fundamental en el tráfico vesicular en el interior celular (Morello *et al.*, 2009).

Por un lado, la PI3K puede activar a la proteína cinasa B o Akt, constituyendo una importante vía de señalización intracelular. Esta vía participa en procesos celulares relacionados con la proliferación, diferenciación y remodelado vascular. Por otro lado, la PI3K también puede estimular la síntesis de NO por la enzima óxido nítrico sintasa de origen endotelial (eNOS), enzima altamente sensible a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, las enzimas óxido nítrico sintasa neural (nNOS) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) no se ven funcionalmente afectadas por la acción de la Akt. La expresión de la iNOS se encuentra aumentada durante los procesos inflamatorios (Morello *et al.*, 2009).

En el MLV, la gran mayoría de los receptores son capaces de modular la contractilidad y otras respuestas mediante la acción de segundos e incluso terceros mensajeros, cuyas vías de señalización muchas veces se entrecruzan. La vía de la PI3K está asociada a la producción del segundo mensajero PIP₃, y potencialmente conectada con vías de regulación metabólica, hipertrofia y supervivencia celular (Ghigo *et al.*, 2017).

Se sabe que la PI3K participa en una gran variedad de procesos fisiológicos como la adhesión celular, el reordenamiento de los filamentos de actina o el tráfico intracelular de membranas (Toker & Cantley, 1997). Además, la PI3K es de vital importancia en los procesos de crecimiento y contractilidad cardiacos (Crackower *et al.*, 2002; McMullen *et al.*, 2003). Diversos estudios demuestran que la PI3K está involucrada en la mala adaptación de la hipertrofia miocárdica causada por mediadores neurohormonales y estrés biomecánico (Patrucco *et al.*, 2004). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales la PI3K participa en los procesos de hipertrofia y remodelado cardiaco se asocian a la activación de GPCR, factores de crecimiento u hormonas (McMullen *et al.*, 2003).

En relación a la regulación del Ca²⁺, se sabe que son varias las isoformas de la PI3K que pueden modular la entrada de Ca²⁺ a través de los canales VOC y que están implicadas en la modulación de la contractilidad del MLV. Esta regulación podría ser directamente sobre los canales VOC o de forma indirecta mediante otros receptores y vías de señalización, aunque se sabe poco de los mecanismos a través de los cuales tiene lugar (Viard *et al.*, 2004).

5.1.1. Regulación del canal VOC tipo-L por las PI3Ks

La regulación de la entrada de Ca²⁺ mediante la fosforilación del canal VOC tipo-L Ca_v1.2 por diferentes cinasas es importante en el acoplamiento excitación-contracción en el corazón (Yang *et al.*, 2009) y en el MLV (Ghosh *et al.*, 2017). Este canal es diana de múltiples cinasas que median señales tanto del sistema renina-angiotensina como del sistema nervioso simpático (Yang *et al.*, 2009).

Las PI3Ks están implicadas en la modulación de la contractilidad del MLV (Kim *et al.*, 2006; Morello *et al.*, 2009). Sin embargo, hay poca información sobre el papel

que juega cada una de las PI3Ks en el control de la función vascular. Se sabe que las clases Ia y Ib participan en la regulación de los canales $Ca_v1.2$ e incrementando las corrientes de Ca^{2+} (Le Blanc *et al.*, 2004).

La PI3K δ , isoforma que forma parte del subgrupo Ia, está relacionada con el aumento del tono basal en las arterias aorta y mesentérica de ratas hipertensas (Northcott *et al.*, 2002, 2005). Dado que una vasoconstricción anormal es una de las muchas complicaciones que tiene la diabetes, es probable que esta isoforma de la PI3K esté de algún modo involucrada en la disfunción vascular presente en esta patología (Pinho *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que diversas vías de señalización e isoformas de la PI3K pueden modular la entrada de Ca^{2+} a través los canales VOC tipo-L. Sin embargo, la cascada de señalización y los mecanismos de transducción que conllevan al incremento del influjo de Ca^{2+} aún no están del todo claros. Por un lado, la PI3K aumenta la expresión de los VOC en la membrana plasmática, y por otro, los regula a través de la fosforilación de un residuo de serina en la subunidad $Ca_v\beta2$. Esta regulación está mediada por la vía Akt/PKB activada por el PIP₃ (Viard *et al.*, 2004). Se ha descrito que tanto las isoformas PI3K γ como PI3K α incrementan la expresión de estos canales, por lo que la regulación no es específica de una sola isoforma (Viard *et al.*, 2004).

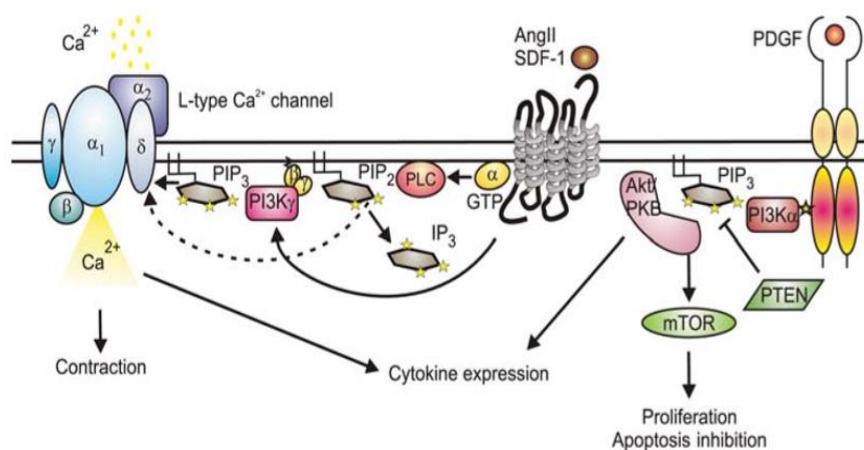


Figura VI. En el MLV, la vía de señalización de la PI3K γ regula procesos como la contracción y la proliferación. En respuesta a agonistas como la ATII, la PI3K γ conduce a la vasoconstricción mediante el incremento de las corrientes de Ca^{2+} a través de los canales VOC tipo-L (Morello *et al.*, 2009).

5.2. Proteín cinasas activadas por mitógenos (MAPK)

Las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) forman parte de la gran familia de las MAPK. Esta familia de serin-treonina cinasas se encuentra involucrada en la contracción del MLV, así como en procesos proliferación, migración, adhesión, diferenciación y supervivencia celular (Pearson *et al.*, 2001). Estas enzimas pueden ser activadas como consecuencia de diversos estímulos extracelulares, incluyendo la ET-1, ATII y la fenilefrina (Phe) (Vignon-Zellweger *et al.*, 2012), o factores como el Ca^{2+} intracelular u otras cinasas como la PKC o la PI3K (Molkentin *et al.*, 2001).

La MAPK cinasa MEK es necesaria para la fosforilación de los residuos de treonina y tirosina de ERK1/2. Una vez activadas, ERK1/2 van a amplificar la señal provocada por estímulos extracelulares a través de la fosforilación de diversos sustratos que incluyen factores de transcripción y otras cinasas (Whitmarsh *et al.*, 1996).

Tanto la Phe como la ET-1 inducen la hipertrofia y el remodelado cardiaco a través de la activación de proteínas Gg, la PLC y pequeñas proteínas como Ras, Rac y Rho mediante la activación de la vía ERK-MAPK (Clerk *et al.*, 2002; Dorn & Force, 2005). Además de estar implicadas en procesos de crecimiento celular, las ERK-MAPK también han demostrado actividad en células diferenciadas no proliferativas (Adam *et al.*, 1993; Hei *et al.*, 1993). Diversos estudios indican que ERK1/2 también presenta un papel crucial en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca tanto en experimentos realizados *in vivo* como *in vitro* (Bueno & Molkentin, 2002; Lu *et al.*, 2009; Yue *et al.*, 2000).

El bloqueo de la vía de señalización de las MAPK provoca una reducción del desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por Phe en cardiomiocitos de rata (Glennon *et al.*, 1996).

Se ha demostrado en arteria aorta que la inhibición de la cascada de señalización de la ERK-MAPK no altera significativamente la contracción inducida por Phe ni por KCl en presencia de Ca^{2+} extracelular pero sí disminuye prácticamente en su totalidad la contracción independiente de Ca^{2+} en respuesta a la Phe. Sin embargo, la inhibición de tal contracción no es completa cuando se utilizan elevadas concentraciones de Phe, a pesar de encontrarse la vía de la ERK-MAPK igualmente bloqueada. Esto sugiere que probablemente existan vías de señalización adicionales que puedan encontrarse

regulando la contracción del MLV en las que la ERK-MAPK se encuentre implicada (Dessy *et al.*, 1998).

Existe escasa información sobre los mecanismos de señalización intracelulares de ET-1 que conllevan la activación de las ERK1/2 en las CMLV humanas. Las señales intracelulares de Ca^{2+} son necesarias para la activación de la vía ERK-MAPK inducida por ATII en las CMLV (Eguchi *et al.*, 1996). Sin embargo, la contracción inducida por ET-1 no se ve afectada tras el bloqueo de los canales VOC tipo-L (McNair *et al.*, 2004), lo que sugiere que la contracción que provoca la ET-1 no asociada a la entrada extracelular de Ca^{2+} parece estar mediada por la actividad de la MAPK y otras cinasas como la PKC, PI3K y RhoK (Dessy *et al.*, 1998; D'Angelo *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha encontrado relación entre la proteína resistina y la ET-1, las cuales se encuentran reguladas al alza en personas que padecen diabetes mellitus tipo II, hipertensión y obesidad central (Chuang *et al.*, 2012). La vía de señalización de la ET-1 participa en el acoplamiento del Ca^{2+} y la vasoconstricción, y se halla relacionada con la regulación de la presión arterial. La resistina produce un incremento de la presión arterial inducida por ET-1 así como en la concentración de Ca^{2+} , efectos que se revierten al utilizar bloqueantes de la entrada SOC y de la vía ERK-MAPK. Esto parece indicar que la resistina provoca incrementos en la concentración de Ca^{2+} inducidos por ET-1 a través de la entrada SOC dependiente de la vía ERK-MAPK (Chuang *et al.*, 2012).

La activación de la vía ERK-MAPK por la ET-1 también contribuye a los procesos de migración y proliferación de las CMLV que tienen lugar en la formación de nueva íntima tras sufrir daño vascular (Hazzalin *et al.*, 2002; Muslin, 2008). Además, esta vía es clave al comienzo del desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, ya que favorece el reclutamiento de monocitos, la formación de células espumosas y el desarrollo de la placa de ateroma (Muslin, 2008).

5.2.1. Regulación del canal VOC tipo-L por las MAPK

Muchas de las proteínas que intervienen en procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento celular como la proteína G Ras, la PI3K o la MAPK, juegan un papel importante en la regulación de canales iónicos con el objetivo de modular diferentes procesos como la proliferación, diferenciación, supervivencia celular o la transcripción génica (Fitzgerald, 2000).

Se ha descrito que la proteína Ras regula los canales VOC tipo-L, -N y -T incrementando la corriente de iones a través de ellos en diferentes tipos celulares de neuronas (Hahnel *et al.*, 1992; Fitzgerald & Dolphin, 1997; Lei *et al.*, 1998). La presencia de una secuencia de consenso en el lazo intracelular que une los dominios I y II del canal neuronal de Ca^{2+} tipo-N ($\text{Ca}_v2.2$) y los 4 tipos de subunidades β de estos canales sugieren que estos canales pueden ser fosforilados por ERK (Martin *et al.*, 2006).

La activación de ERK depende de la proteína efectora Ras, que va a iniciar la cascada de señalización de la MAPK. Ras va a activar a Raf-1, la cual va a fosforilar a MEK (o MAPKK), que a su vez va a fosforilar y activar a las MAPK ERK1/2 (Marshall, 1996). Esta vía es esencial en los procesos de diferenciación y proliferación celular, aunque el aumento de los flujos de Ca^{2+} a través de los canales VOC parece ser que se debe principalmente a la modulación por Ras-MAPK de la actividad de los canales ya existentes y no a la síntesis de nuevos canales vía expresión de genes mediada por esta vía (Fitzgerald, 2000).

5.3. Proteín cinasa C (PKC)

La familia de la PKC se compone de 12 isoformas diferentes, clasificadas en tres grupos de acuerdo a sus características de activación (Dempsey *et al.*, 2000).

Un primer grupo lo conforman las denominadas PKC convencionales o clásicas: α , β_1 , β_2 y γ , las cuales requieren Ca^{2+} y DAG para su activación. En el segundo grupo se encuentran las isoformas denominadas nuevas o noveles, y lo conforman las isoformas δ , ϵ , η y θ . Éstas se activan mediante el DAG, pero al contrario que las isoformas convencionales, no requieren Ca^{2+} para su activación.

Revisión Bibliográfica

Por último se encuentra el tercer grupo de isoformas de la PKC, las cuales son denominadas atípicas y está formado por las isoformas ζ , $1/\lambda$ y λ , las cuales no necesitan ni Ca^{2+} ni DAG para su activación (Gerald and King., 2010).

En el corazón, las isoformas de la PKC son activadas a través de GPCR a los que se unen diferentes agonistas como NA, ET-1, ATII y serotonina (Dorn *et al.*, 1999). Las fosfolipasas activadas por esta vía dan como resultado de su hidrólisis fosfolípidos de inositol y DAG, el cual es responsable de la activación de la región catalítica de la PKC (Puceat *et al.*, 1994). Las diferentes isoformas de la PKC responden de forma diferente a neurohormonas y actúan de distinta forma sobre la función cardiaca, ya que cada isoforma de la PKC tiene un sustrato óptimo, permitiendo que diferentes isoformas sean capaces de fosforilar distintas subunidades del canal o incluso distintos sitios dentro de la misma subunidad de una manera específica (Puceat *et al.*, 1994).

La gran familia de la PKC presenta diversa dependencia del Ca^{2+} y fosfolípidos, así como diferente localización y sustratos sobre los que actúa en función de cada isoforma. La PKC es fundamentalmente citosólica, y tras la activación de las CMLV, es fosforilada y sufre procesos de maduración y traslocación a la membrana plasmática, núcleo y RS, los cuales son facilitados por proteínas de anclaje. La PKC, una vez activada, va a producir la fosforilación de distintos sustratos como canales y bombas iónicas u otras proteínas (Liu & Khalil, 2018). Se sabe que, en el MLV, la PKC regula la actividad de los VOC, los canales BK_{Ca} , los canales de K^+ sensibles a ATP y los canales de cationes no selectivos (Crozatier, 2006), siendo así una de las principales enzimas reguladoras de la función vascular.

Además de regular el flujo de iones hacia el interior celular, la PKC participa también en la regulación de la contracción vascular, pues va a fosforilar la CPI-17 causando la consecuente inhibición de la MLCP e incrementando de este modo la fosforilación de la MLC, promoviendo así la contracción del MLV. Por otro lado, la PKC va a activar la cascada de proteínas cinasas que conlleva la fosforilación de las proteínas de unión a actina calponina y caldesmon, aumentando la interacción actina-miosina y favoreciendo la contracción (Liu & Khalil, 2018).

Hace ya varias décadas se propuso que la activación de la PKC podría estar involucrada en la contracción inducida por ET-1 (Chabrier *et al.*, 1989; Ohlstein *et al.*, 1989). Se ha observado que en la arteria aorta de rata, la ET-1 provoca vasoconstricción de forma dosis-dependiente, y que esta contracción es inhibida de forma significativa al utilizar un inhibidor de la PKC (Shimamoto *et al.*, 1992). Además, se ha comprobado que la vasoconstricción inducida por ET-1 tiene lugar en condiciones libres de Ca^{2+} y de bloqueo de los canales VOC tipo-L con nifedipina, lo que sugiere que este tipo de contracción ocurre o bien por los efectos de movilización de Ca^{2+} intracelular o bien a través de mecanismos independientes de Ca^{2+} , los cuales se han asociado a la activación de la PKC (Shimamoto *et al.*, 1992).

En el MLV, los ésteres del forbol, los cuales inducen la activación de la PKC, provocan una contracción lenta pero sostenida de igual forma que la ET-1, lo cual supone que la PKC podría jugar un papel regulador en el mantenimiento del tono miogénico (Rasmussen *et al.*, 1987). Por otro lado, la PKC puede ser activada por el DAG generado como consecuencia de la unión de la ET-1 a su receptor, participando de forma directa en procesos vasoconstrictores (Chen *et al.*, 2009).

5.3.1. Regulación del canal VOC tipo-L por la proteína cinasa C (PKC)

La gran familia de las cinasas PKC es capaz de modular la contracción cardíaca de diferentes maneras, aumentando o deprimiendo la fuerza de la contracción y relajación muscular. En la subunidad α_1C del canal $Ca_v1.2$ se han identificado siete sitios de fosforilación diferentes para la PKC. Esta fosforilación se encuentra inhibida en presencia de un inhibidor de esta enzima (Yang *et al.*, 2009).

La regulación de la subunidad α_1C es importante para la función del canal de Ca^{2+} y el acoplamiento excitación-contracción. En los cardiomiocitos se expresan las isoformas de la PKC convencional (PKC α), novel (PKC δ y PKC ϵ) y atípica (PKC λ), e incluso se ha llegado a detectar en ocasiones la expresión de PKC β (Yang *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que la serina 1928, localizada en el extremo C-terminal y considerada uno de los residuos responsables y más importantes de la regulación de la subunidad del canal, es fosforilada por las isoformas PKC α , PKC ϵ , PKC ζ e incluso por la PKD (Yang *et al.*, 2005).

Revisión Bibliográfica

La serina 1928 también es responsable de la regulación al alza de la entrada de Ca^{2+} por acción de la PKA, aunque se sabe muy poco al respecto debido a la escasez de esta proteína en la membrana, lo cual dificulta mucho su estudio. Se sabe que la inhibición de la PKA bloquea el aumento de las corrientes $\text{Ca}_v1.2b$ producido por un análogo del AMPc, el 8-Br-AMPc (Ruiz-Velasco *et al.*, 1998).

Por otro lado, se ha demostrado que la $\text{PKC}\alpha$ también fosforila el inhibidor de la proteína fosfatasa-1, que ejerce una inhibición directa sobre la misma, favoreciendo de este modo que el canal se mantenga fosforilado. Sin embargo, se ha evidenciado que la regulación del canal VOC tipo-L se debe sobre todo a la acción directa que ejerce la $\text{PKC}\alpha$ fosforilando el canal y no tanto a una inhibición de la actividad de la fosfatasa (Yang *et al.*, 2009).

Cabe destacar también el papel de la PKG, ya que entre sus funciones se encuentra la acción inhibitoria sobre los canales $\text{Ca}_v1.2b$. Se ha observado que el NO, los donantes de NO como el nitroprusiato sódico y el análogo del GMPc, 8-Br-GMP, reducen las corrientes $\text{Ca}_v1.2b$, efecto que disminuye al utilizar inhibidores de la PKG (Ruiz-Velasco *et al.* 1998).

Aun así, existen otros métodos de regulación de los canales VOC tipo-L. Varios estudios han contemplado la regulación del canal a nivel vascular por otras cinasas, además de demostrar la existencia de regulación adrenérgica, ya que una sustitución de la serina 1928 por una alanina mantiene una regulación al alza del canal con un incremento de la entrada de Ca^{2+} debido a la acción de agonistas β -adrenérgicos (Yang *et al.*, 2009).



IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y Objetivos

Los estados de resistencia a la insulina juegan un papel clave en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo II, y se encuentran estrechamente relacionados con otras alteraciones vasculares y metabólicas como la obesidad, la dislipemia y la hipertensión, que en conjunto forman lo que se conoce como síndrome metabólico (Ford, 2005). En la resistencia a la insulina se produce un desequilibrio entre las acciones vasculares de esta hormona que dependen de las vías de señalización de la PI3K y la MAPK en el endotelio vascular, lo que conduce a una alteración de la vía de la PI3K/eNOS/NO y a un incremento de la actividad de las vías MAPK/ET-1, provocando disfunción endotelial y una vasoconstricción exacerbada (Kim *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2013). Sin embargo, las alteraciones de la homeostasis del Ca^{2+} en la pared arterial están implicadas también de forma importante en la vasoconstricción anormal y en las complicaciones vasculares como la hipertensión o la enfermedad coronaria asociadas a la enfermedad metabólica y a estados de resistencia a la insulina (Okon *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2010; Villalba *et al.*, 2011).

La contracción del MLV tiene lugar por un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que puede deberse al influjo de Ca^{2+} extracelular y/o a la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del RS. Este incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ va a producir la contracción del MLV a través de la vía Ca^{2+} -CaM-MLC y la consecuente formación de puentes cruzados de actina/miosina (Liu & Khalil, 2018). Sin embargo, la vasoconstricción arterial puede estar mediada también por mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} , que consisten en el desarrollo de la fuerza de contracción a una determinada $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que provoca una disociación entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la fosforilación de la MLC y la contracción (Somlyo & Somlyo, 2003; Villalba *et al.*, 2007). La entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de la membrana plasmática, la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} contribuyen de forma diferente a la contracción en función del agonista vasoconstrictor y del diámetro vascular. Además, la contribución relativa de diferentes proteínas cinasas a la vasoconstricción mediada por receptor también depende del tamaño del vaso, pues a menor tamaño arterial la participación de la PKC aumenta mientras que la aportación de la RhoK disminuye (Kitazawa & Kitazawa, 2012; Martinsen *et al.*, 2012).

Hipótesis y Objetivos

A pesar de que cinasas como la PKC y la RhoK han sido clásicamente asociadas a mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil del MLV (Nobe & Paul, 2001; Somlyo & Somlyo, 2003; Villalba *et al.*, 2007), la evidencia experimental sugiere que tanto la movilización de Ca^{2+} intracelular como la entrada de Ca^{2+} extracelular pueden encontrarse moduladas por proteínas cinasas en el MLV y en los miocitos cardíacos (Ghisalal *et al.*, 2003; Villalba *et al.*, 2008; Smani *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que existen diferencias entre las arterias grandes o de conductancia y las pequeñas o de resistencia en relación a la regulación de procesos asociados al Ca^{2+} por diferentes cinasas (Kitazawa & Kitazawa, 2012; Martinsen *et al.*, 2012).

Las pequeñas arterias de resistencia, cuya vasoconstricción se encuentra bajo el control del sistema nervioso simpático, juegan un papel esencial en la regulación de la presión arterial, siendo la hipertensión una de las complicaciones vasculares más frecuentes que aparecen en estados de resistencia a la insulina y en el síndrome metabólico (Ford, 2005). Tanto la alteración de vías de señalización que incluyen cinasas como la PI3K, la MAPK o la PKC en células del endotelio vascular, así como un metabolismo del Ca^{2+} anormal, son factores que contribuyen a una vasoconstricción anómala en la enfermedad vascular (Okon *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Villalba *et al.*, 2011; Prieto *et al.*, 2013).

Agentes farmacológicos como las DHP que bloquean los canales VOC tipo-L han sido utilizados en el tratamiento de la hipertensión, ya que producen un descenso de la presión arterial al inhibir la entrada de Ca^{2+} extracelular y reducir así la vasoconstricción (Richard, 2005). Este tipo de fármacos también tienen actividad cardioprotectora, ya que además de reducir la presión arterial también reducen la potente contracción en respuesta al péptido endotelial ET-1 y mejoran la relajación dependiente del endotelio (Sudano *et al.*, 2007). Sin embargo, una parte importante de la vasoconstricción de la ET-1 es independiente de Ca^{2+} y resistente al bloqueo de los canales VOC, y se ha relacionado con la actividad de cinasas como la PI3K, la MAPK, la PKC y la RhoK (Tykocki & Watts, 2010). La activación de estas cinasas por la ET-1 podría jugar un importante papel en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares al contribuir a la potenciación de la vasoconstricción, al aumento de procesos

Hipótesis y Objetivos

proliferativos y al incremento de los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil del MLV.

Por todo lo expuesto, el objetivo general de este proyecto de Tesis Doctoral fue determinar la participación de las proteínas cinasas PI3K, MAPK y PKC en las vías de señalización de Ca^{2+} acopladas a receptor en el MLV de arterias de resistencia.

Los objetivos específicos de esta investigación fueron:

1. Determinar la contribución relativa a la vasoconstricción mediada por el receptor α_1 -adrenérgico de los mecanismos de entrada de Ca^{2+} , movilización de Ca^{2+} intracelular y de sensibilización al Ca^{2+} en arterias de resistencia.
2. Evaluar si las cinasas PI3K, MAPK y PKC participan en la regulación de los mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico.
3. Determinar la contribución relativa a la vasoconstricción mediada por el receptor de ET de la entrada de Ca^{2+} , movilización de Ca^{2+} intracelular y mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en el MLV de arterias de resistencia.
4. Evaluar si las cinasas PI3K, MAPK y PKC participan en la regulación de los mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor de ET.



V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Material biológico

Se utilizaron arterias procedentes de ratas Wistar macho sexualmente maduras como modelo experimental. Los animales fueron criados y estabulados en las instalaciones del Animalario de la Facultad de Farmacia (nº de registro ES280790000085) en condiciones controladas de luz (ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad), humedad (50-60%) y temperatura (24°C), y alimentados con pienso y agua *ad libitum* hasta el momento de su sacrificio, con 12 semanas de edad, de acuerdo a la legislación vigente sobre protección de animales de experimentación y otros fines científicos (R.D. 1201/2005).

Los protocolos experimentales se realizaron acorde a la Directiva Europea sobre la Protección de Animales Utilizados con Fines Científicos (European Union Directive 2010/63/EU) y fueron aprobados por el comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

Después del sacrificio de los animales se procedió, con ayuda de un microscopio estereoscópico, a la microdissección de las arterias de resistencia. Se disecaron ramas de tercer orden de arterias mesentéricas para el estudio comparativo de los mecanismos de regulación del Ca^{2+} en lechos vasculares periféricos.

1.2. Material de laboratorio

1.2.1. Instrumentación general

Los aparatos utilizados para la preparación de soluciones y medios fisiológicos fueron los siguientes:

- 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 registrar la tensión isométrica de las micropreparaciones arteriales

- Miógrafos microvasculares dobles de alambres modelo 410A con 10 mL de capacidad, con regulador de temperatura y con dos sitios de montaje unidos a dos transductores de fuerza isométricos (Danish Myo Technology, Dinamarca).
- Polígrafos Houston de dos canales para registrar de forma analógica 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 realizar la disección y montaje de las preparaciones arteriales.

1.2.3. Equipamiento para el registro simultáneo de la concentración intracelular de Ca^{2+} y de la tensión isométrica en micropreparaciones arteriales

- Monocromador DeltaRAM X (Photon Technology International) usado para excitar a dos longitudes de onda: 340 nm y 380 nm.
- Sistema de detección fotomultiplicador 814 (Photon Technology International).
- Lámpara UV de Xenon LPS-220B (Photon Technology International).
- Miógrafo vascular simple de 8 mL de capacidad con regulación de temperatura y con un transductor de fuerza isométrica (Danish Myo Technology, Dinamarca). Este miógrafo sólo permite montar un segmento arterial al mismo tiempo, por lo que se montaron arterias en días consecutivos.
- Microscopio de fluorescencia invertido Zeiss, Axiovert S100 T (Photon Technology International), sobre el que se colocó el miógrafo para el enfoque del segmento arterial. Se utilizó un objetivo para fluorescencia Olympus LUCPlanFLN 20x.

1.3. Reactivos

Los reactivos y compuestos utilizados en la realización de los experimentos fueron los siguientes:

- Acetilcolina (Ach) clorato (Sigma Aldrich, España).
- CPA (Ácido ciclopiazónico), bloqueante de la SERCA (Tocris Cookson, UK).
- Cremophor (Sigma Aldrich, España).
- EGTA, agente quelante (Sigma Aldrich, España).
- Endotelina (ET-1) humana/porcina (Tocris Cookson, UK).

Material y Métodos

- Fura-2 AM (Sigma Aldrich, España).
- GF-109203-X, inhibidor de la PKC (Tocris Cookson, UK).
- Guanetidina sulfato, neurotoxina adrenérgica (Sigma Aldrich, España).
- L-Fenilefrina (Phe) clorhidrato, agonista α_1 -adrenérgico (Sigma Aldrich, España).
- LY-294002 hidrocloreuro, inhibidor selectivo de la PI3K (Tocris Cookson, UK).
- Nifedipina, bloqueante de los canales VOC tipo-L (Sigma Aldrich, España).
- PD-98059, inhibidor específico de la MAPK (Tocris Cookson, UK).
- Pluronic (Sigma Aldrich, España).
- Pyr6, inhibidor selectivo de la entrada de Ca^{2+} via STIM/Orai1 (Tocris Cookson, UK).
- Rianodina, bloqueante selectivo del receptor de rianodina (Tocris Cookson, UK).
- SB-203580, inhibidor de la p38-MAPK (Tocris Cookson, UK).

1.4. Soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas con sales inorgánicas Merck de grado analítico, disueltas en agua desionizada de alta pureza (Mili-Q).

1.4.1. Soluciones fisiológicas

1.4.1.1. Solución salina fisiológica (PSS)

La composición utilizada, expresada en mM, fue la siguiente:

➤ Cloruro sódico (NaCl)	119.00
➤ Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	25.00
➤ Cloruro potásico (KCl)	4.6
➤ Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.40
➤ Cloruro magnésico (MgCl ₂)	1.20
➤ Cloruro cálcico (CaCl ₂)	1.50
➤ Ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA)	0.027
➤ Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11.00

La solución PSS fue preparada diariamente diluyendo los reactivos en agua desionizada en continua agitación. Una vez añadidos todos los compuestos salvo el CaCl₂, se oxigenó la solución durante 20 minutos con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂) para ajustar el pH a 7,4. La adición de EDTA tuvo como objetivo retrasar la oxidación e impedir el crecimiento de microorganismos en la solución.

1.4.1.2. Solución salina fisiológica rica en potasio (KPSS)

En esta solución, igualmente preparada de forma diaria, se sustituyeron cantidades equimolares de NaCl por KCl en relación a la solución PSS. Su composición, expresada en mM, fue:

➤ Cloruro potásico (KCl)	119.00
➤ Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	25.00
➤ Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	1.40
➤ Cloruro magnésico (MgCl ₂)	1.20
➤ Cloruro cálcico (CaCl ₂)	1.50
➤ Ácido etiléndiaminotetraacético (EDTA)	0.027
➤ Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	11.00

Los reactivos se diluyeron conjuntamente en agua desionizada en agitación, y una vez añadidos todos los compuestos salvo el CaCl₂, se oxigenó la solución durante 20 minutos con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂), tras lo cual se añadió el CaCl₂.

1.4.1.3. Solución salina fisiológica libre de Ca²⁺ (PSS⁰₀)

Para evaluar la dependencia que presenta la vasoconstricción arterial del Ca²⁺ extracelular, en los experimentos fue utilizada una solución salina fisiológica libre de Ca²⁺, la cual se preparó de la misma forma que la solución PSS pero sin Ca²⁺ (solución “nominalmente libre de calcio”, PSS⁰₀) o sustituyendo el CaCl₂ por 0.1 mM de EGTA (PSS⁰_{0.1}), un compuesto quelante de los iones Ca²⁺.

1.4.1.4. Solución salina fisiológica rica en potasio y libre de Ca^{2+} (KPSS⁰₀)

En los experimentos también se utilizó una solución de salina fisiológica libre de Ca^{2+} y rica en K^+ , la cual se preparó de la misma forma que la solución KPSS pero sin Ca^{2+} (KPSS⁰₀) o sustituyendo el $CaCl_2$ por 0.1 mM de EGTA (KPSS⁰_{0.1}).

1.4.2. Soluciones de calibración para los experimentos de fura-2

1.4.2.1. K^+ -Hepes⁰

Ajustando a pH 4.45, su composición, expresada en mM, fue:

➤ Cloruro potásico (KCl)	144.6
➤ Cloruro magnésico ($MgCl_2$)	1.2
➤ HEPES	5.0
➤ Glucosa	6.1
➤ EGTA	2.0

1.4.2.2. K^+ -Hepes⁵

Ajustando a pH 7.45, su composición, expresada en mM, fue:

➤ Cloruro potásico (KCl)	144.6
➤ Cloruro magnésico ($MgCl_2$)	1.2
➤ HEPES	5.0
➤ Glucosa	6.1

2. MÉTODOS

2.1. Metodología para estudios funcionales

2.1.1. Estudio de la reactividad arterial

2.1.1.1. Preparación y disección de los segmentos arteriales

Para la realización de los experimentos se utilizaron arterias mesentéricas de ratas Wistar de 12 semanas de edad, sacrificadas por dislocación cervical y exanguinación. El intestino fue extraído del animal recién sacrificado y se mantuvo refrigerado (entre 4-8°C) en PSS para la inmediata disección de las arterias. Para ello se dispuso de un microscopio estereoscópico y una fuente de luz fría, retirando con ayuda de pinzas y tijeras de microdisección el tejido conjuntivo y adiposo que rodea las arterias mesentéricas. Se obtuvieron así segmentos arteriales limpios de aproximadamente 2 mm de longitud.

2.1.1.2. Montaje de las arterias

Los segmentos arteriales obtenidos fueron montados en paralelo en miógrafos microvasculares dobles de alambres modelo 410A, introduciendo dos alambres de tungsteno (de 40 µm de diámetro) a través de la luz vascular de cada segmento arterial, atando y fijando los extremos de los alambres a unos tornillos. Cada uno de los dos canales de montaje de los que dispone el miógrafo se encuentra conectado por un lado a un transductor de fuerza isométrico, que permite registrar los cambios de tensión en las arterias, y por otro, a un tornillo micrométrico que regula la separación entre los alambres que atraviesan el segmento arterial (Mulvany y Halpern, 1977).

2.1.1.3. Normalización de las arterias

Tras montar los segmentos arteriales en el miógrafo, se estabilizaron durante 30 minutos en PSS, a una temperatura de 37°C y aireadas con carbógeno (95% O₂/5% CO₂) para mantener un pH fisiológico de 7,4. Posteriormente, se determinó el diámetro óptimo de trabajo (11) para cada preparación. Para ello, se calculó la relación entre la tensión en reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso, lo que permite determinar el valor de circunferencia interna (L100) correspondiente a una

presión transmural de 100 mmHg para un vaso relajado in situ. A continuación se movió el tornillo micrométrico con el fin de ajustar el vaso a una circunferencia interna L1, a la cual el desarrollo de la fuerza es máximo, siendo $L1=0.9 \times L100$. El cálculo del diámetro luminal interno efectivo se determinó como $l1 = L1/\pi$ (Mulvany y Halpern, 1977).

2.1.2. Determinación del Ca^{2+} intracelular por ratio-fluorimetría

2.1.2.1. Introducción a la fluorescencia

El uso de sondas fluorescentes ha sido el método más extendido para medir la $[Ca^{2+}]_i$ a la hora de realizar estudios de sensibilización al Ca^{2+} y de entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática en el MLV (Himpens y Casteels, 1987). Actualmente se utilizan como indicadores de la $[Ca^{2+}]_i$ sondas como la sonda fluorescente fura-2, que presenta muchos aspectos mejorados en relación a otros indicadores usados anteriormente como Quin2 (Grynkiewicz *et al.* 1985). En la molécula fura-2, cuatro grupos carboxilo forman el sitio de unión al Ca^{2+} , y un grupo derivado del estilbeno es el responsable de sus propiedades fluorescentes. La capacidad hidrofílica del fura-2 le permite unirse de forma específica al Ca^{2+} , pero al formar un acetoximetil éster (fura-2 AM) adquiere la liposolubilidad necesaria para atravesar las membranas biológicas. Una vez en el citosol, las esterasas citoplasmáticas escinden el enlace éster liberando el ácido, el cual queda en el citosol debido a su naturaleza hidrofílica, lo que le permite unirse al Ca^{2+} libre para formar el complejo fura- Ca^{2+} . La molécula fura-2 presenta fluorescencia en cualquiera de sus formas, tanto libre como unida al Ca^{2+} , pero en esta forma su fluorescencia se incrementa hasta dos veces, y su espectro de excitación se desplaza a longitudes de onda menores (entre 362 y 335 nm). La excitación del complejo fura- Ca^{2+} da lugar a un máximo de emisión fluorescente situado a 510 nm.

El desplazamiento de la longitud de onda que se produce se mide como el ratio entre la emisión a una longitud de onda de excitación a 340 nm (F_{340}) y a 380 nm (F_{380}). El ratio ($R=F_{340}/F_{380}$) se relaciona con la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la siguiente ecuación (Grynkiewicz *et al.*, 1985):

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * F_{380max}/F_{380min}$$

Donde Kd es la constante de disociación del complejo fura-2/Ca²⁺; R_{min} y R_{max} son el ratio mínimo (ausencia de Ca²⁺) y el ratio máximo (saturación de Ca²⁺); F_{380máx} y F_{380min} son la emisión máxima (ausencia de Ca²⁺) y emisión mínima (saturación de Ca²⁺) con excitación a 380 nm.

2.1.2.2. Medidas simultáneas de la tensión isométrica y la [Ca²⁺]_i

Los registros simultáneos de [Ca²⁺]_i y tensión se llevaron a cabo utilizando ramas de tercer orden de arterias mesentéricas. Dichas arterias fueron montadas en un miógrafo simple (*ver apartado 2.1.1.2.*) de acuerdo a la técnica descrita por Jensen *et al.* (1992) para arterias de resistencia mesentéricas. El protocolo de “loading” (o “cargado”) con fura-2 en las arterias se realizó incubando las preparaciones arteriales con fura-2AM (8 μM) durante hora y media en completa oscuridad a 37°C, lavando un mínimo de 3 veces consecutivas con PSS y realizando los lavados en intervalos de 15 minutos tras la incubación (Villalba *et al.*, 2007).

El miógrafo fue colocado sobre la pletina de un microscopio invertido Zeiss Axiovert S100, donde la preparación se iluminó alternativamente con distintas longitudes de onda, 340 y 380 nm, a una frecuencia de 10 Hz. Dichas longitudes de onda se corresponden con los máximos de los registros de fluorescencia de fura-2 saturado de Ca²⁺ (340 nm) y de fura-2 libre (380 nm). El haz de luz monocromada se dirige desde una rueda de filtros hasta el microscopio a través de una guía líquida. La luz se refleja hacia el objetivo mediante un espejo dicróico que trasmite longitudes de onda superiores a 430 nm y refleja las 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 (F₃₄₀ y F₃₈₀) y la fuerza (mN) son registradas de forma simultánea mediante el software Felix (Photon Technology International, USA). Los valores indicados anteriormente (R_{min}, R_{max}, F_{380máx} y F_{380min}) se determinaron mediante un método que compromete la viabilidad de la preparación, por lo que se obtuvieron al final de cada protocolo experimental.

Para obtener las mínimas condiciones de Ca^{2+} y de saturación se realizó la incubación de la preparación con el ionóforo ionomicina en una solución con EGTA (K^+ -Hepes⁰) y con una solución rica en Ca^{2+} (K^+ -Hepes⁵), respectivamente (*ver apartado 1.4.2*). Finalmente, la contribución de la fluorescencia inespecífica se determinó mediante el “quenching” (o “apagado”) del fura-2 con Mn^{2+} , cuyos valores obtenidos se sustrajeron de todas las medidas obtenidas durante el experimento para minimizar así el posible error.

Los registros mostrados en el presente trabajo corresponden al ratio F_{340}/F_{380} en función del tiempo, expresados como valores absolutos o bien como porcentaje de la señal máxima en cada arteria inducida por la despolarización de la membrana con una solución rica en potasio (KPSS, 120 mM).

2.1.3. Protocolos experimentales para los estudios funcionales.

Los experimentos de reactividad vascular se realizaron el día del sacrificio del animal. En el miógrafo se montaron segmentos arteriales para comprobar su viabilidad. Una vez montados y normalizados los segmentos, se procedió a eliminar el endotelio, ya que los experimentos llevados a cabo se realizaron en arterias desprovistas de endotelio con el fin de valorar las variaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ del MLV. Para ello, tras montar los segmentos, se eliminó el endotelio de los vasos de forma mecánica utilizando un pelo y guiándolo suavemente sobre la superficie interna de la pared vascular con cuidado de no dañar la musculatura. Posteriormente se comprobó la integridad del endotelio vascular mediante una adición de una dosis de Phe (1 μM) para contraer los segmentos, y una vez estabilizada la contracción se añadió una dosis de Ach (10 μM) que, en presencia de endotelio, produce una relajación en la arteria proporcional a la cantidad de endotelio funcional presente en el vaso, mientras que en ausencia de endotelio la arteria permanece contraída.

Una vez comprobada la función endotelial, se procedió a verificar la integridad de la pared muscular así como su capacidad de contracción, mediante dos adiciones consecutivas de KPSS (120 mM) al baño del miógrafo, de 3 minutos de duración cada una y espaciadas por lo menos 10 minutos para permitir y asegurar la completa relajación del vaso.

Material y Métodos

Posteriormente, y de forma previa a la realización de los experimentos, se incubaron las arterias con guanetidina (10 μM) durante al menos 45 minutos para producir una denervación adrenérgica. Dicho inhibidor se mantuvo presente después durante todo el protocolo experimental.

El posible papel de las cinasas ERK-MAPK, p38-MAPK, PI3K y PKC en la regulación de la entrada y movilización de Ca^{2+} acopladas tanto al receptor α_1 -adrenérgico como al receptor de ET fue estudiado en arterias de resistencia mesentéricas sin endotelio en un medio totalmente libre de Ca^{2+} .

Para ello, los segmentos arteriales se mantuvieron durante 5 minutos en $\text{PSS}^{0.1}$, eliminando así el Ca^{2+} extracelular disponible para el proceso de contracción. Después se realizaron tres lavados consecutivos con PSS^0 , medio en el que se realizaron las CCR para CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias previamente activadas con Phe (10 μM) o ET-1 (30 nM), en ausencia, en el caso de los controles, y en presencia de: un bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L (nifedipina, 0.3 μM); de un inhibidor selectivo de la liberación de Ca^{2+} del RS vía STIM/Orai1 (Pyr6, 3 μM); o inhibidores específicos de la ERK-MAPK (PD-98059, 3 μM), p38MAPK (SB-203580, 0.3 μM), PI3K (LY-294002, 3 μM) o PKC (GF-109203X, 0.2 μM). Los efectos de dichos inhibidores también fueron estudiados en arterias activadas con KPSS^0 en lugar de Phe o ET-1. Tras una primera CCR para el CaCl_2 , la cual fue usada como curva control, se realizaron al menos tres lavados consecutivos durante 45 minutos, con un intervalo de unos 15 minutos entre lavados. Posteriormente, los vasos fueron incubados con los inhibidores durante 30 minutos, tras lo cual se realizó otra CCR para el CaCl_2 .

El efecto de la depleción de Ca^{2+} de los almacenes del RS acoplada al receptor α_1 -adrenérgico sobre la entrada de Ca^{2+} y la contracción, fue estudiado en arterias sin endotelio y mantenidas en PSS^0 , estimuladas con Phe (10 μM) y posteriormente activadas con una dosis única de CaCl_2 (1 mM), antes y después de la inhibición de la SERCA con ácido ciclopiazónico (CPA, 10 μM). Este efecto también fue estudiado mediante el tratamiento conjunto de CPA y nifedipina (0.3 μM).

El efecto combinado de la depleción de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} con CPA (10 μM) y la entrada de Ca^{2+} mediada por STIM/Orai1 con Pyr6 (3 μM) también se evaluó en la entrada de Ca^{2+} y en la vasoconstricción de arterias mesentéricas estimuladas con Phe (10 μM).

Para estudiar la potencial relación entre las cinasas PI3K, MAPK y PKC, y el mecanismo CICR mediado por el RyR en arterias de resistencia mesentéricas (Sánchez *et al.*, 2018), el RyR fue bloqueado tratando las arterias durante al menos 25 minutos con rianodina (10 μM) y adicionando posteriormente una única dosis de CaCl_2 (1.5 mM) a las arterias despolarizadas con KPSS⁰. El efecto de las cinasas PI3K, MAPK y PKC se evaluó mediante el uso de inhibidores selectivos de las mismas en condiciones de bloqueo del RyR.

2.2. Cálculo y análisis estadístico de los resultados

La sensibilidad de los agonistas tanto contráctiles como relajantes se expresa en términos de concentración eficaz 50 (EC_{50}) o de pD_2 . La EC_{50} se define como la concentración del agonista que produce el 50% del efecto o respuesta máxima (E_{max}), mientras que el parámetro pD_2 es el valor negativo del logaritmo de la EC_{50} .

La contracción máxima (C_{max}) de los agonistas se expresa en valores absolutos (Nm^{-1}) o relativos, como porcentaje de la respuesta máxima inducida por un agonista contráctil en cada arteria ($\%C_{\text{max}}$) o en relación a la respuesta máxima obtenida al despolarizar con KPSS ($\% \text{KPSS}$).

La EC_{50} fue estimada determinando el ajuste (“fitting”) de la respuesta del vaso según la ecuación de Hill:

$$E = E_{\text{máx}} \cdot A (M)^n / A (M)^n + EC_{50} (M)^n$$

Siendo “E” la respuesta máxima del vaso para una concentración “A (M)” de agonista, “ $E_{\text{máx}}$ ” la respuesta máxima del vaso para ese mismo agonista y “n”, un parámetro de ajuste de la curva llamado Coeficiente de Hill.

Material y Métodos

Todos los resultados obtenidos se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM) de un número “n” de vasos. La evaluación estadística de las medias se realizó a través del test estadístico de la *t* de Student para observaciones tanto pareadas como 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. Se consideró estadísticamente significativo un nivel de probabilidad inferior a un 5% ($P < 0,05$).



VI. RESULTADOS

1. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA

1.1. Mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia

Para estudiar los procesos de movilización de Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia, se utilizaron arterias mesentéricas desprovistas de endotelio y denervadas con guanetidina (10 μ M). Las arterias se mantuvieron en PSS⁰, tras lo cual fueron activadas con Phe (10 μ M) y posteriormente estimuladas con concentraciones crecientes de Ca^{2+} (desde 10 μ M a 10 mM) (**Figura 1A**). La Phe indujo un incremento inicial rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ junto a una vasoconstricción asociada a dicho incremento, indicando un proceso de movilización de Ca^{2+} intracelular (**Figuras 1A, C**). Además, también se produjo una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ promoviendo la vasoconstricción tras la re-adición de Ca^{2+} , lo cual indica entrada de Ca^{2+} extracelular en el MLV (**Figuras 1A, B**). Mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción inducidas por Phe en relación al KPSS correspondientes al proceso de movilización de Ca^{2+} intracelular (**Figura 1C**), sí que se observó un aumento de la contracción inducido por Phe mayor que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ tras la adición de Ca^{2+} al medio (**Figura 1D**). Esto sugiere que existe un proceso de sensibilización al Ca^{2+} acoplado a la activación del receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia. Dicho proceso de sensibilización se puede deducir mejor al representar gráficamente el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ frente a la tensión, observándose una pendiente pronunciada de la relación $[Ca^{2+}]_i$ -tensión que indica un desarrollo de una gran contracción sin necesidad de una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ equivalente (**Figura 1D**).

El tratamiento con el bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L, nifedipina (0.3 μ M), inhibió significativamente la CCR para el $CaCl_2$ en arterias activadas con Phe (**Figura 2A; Tabla 1**), mientras que el inhibidor de la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1, Pyr6 (3 μ M), produjo una reducción moderada de estas respuestas (**Figura 2B; Tabla 1**).

Resultados

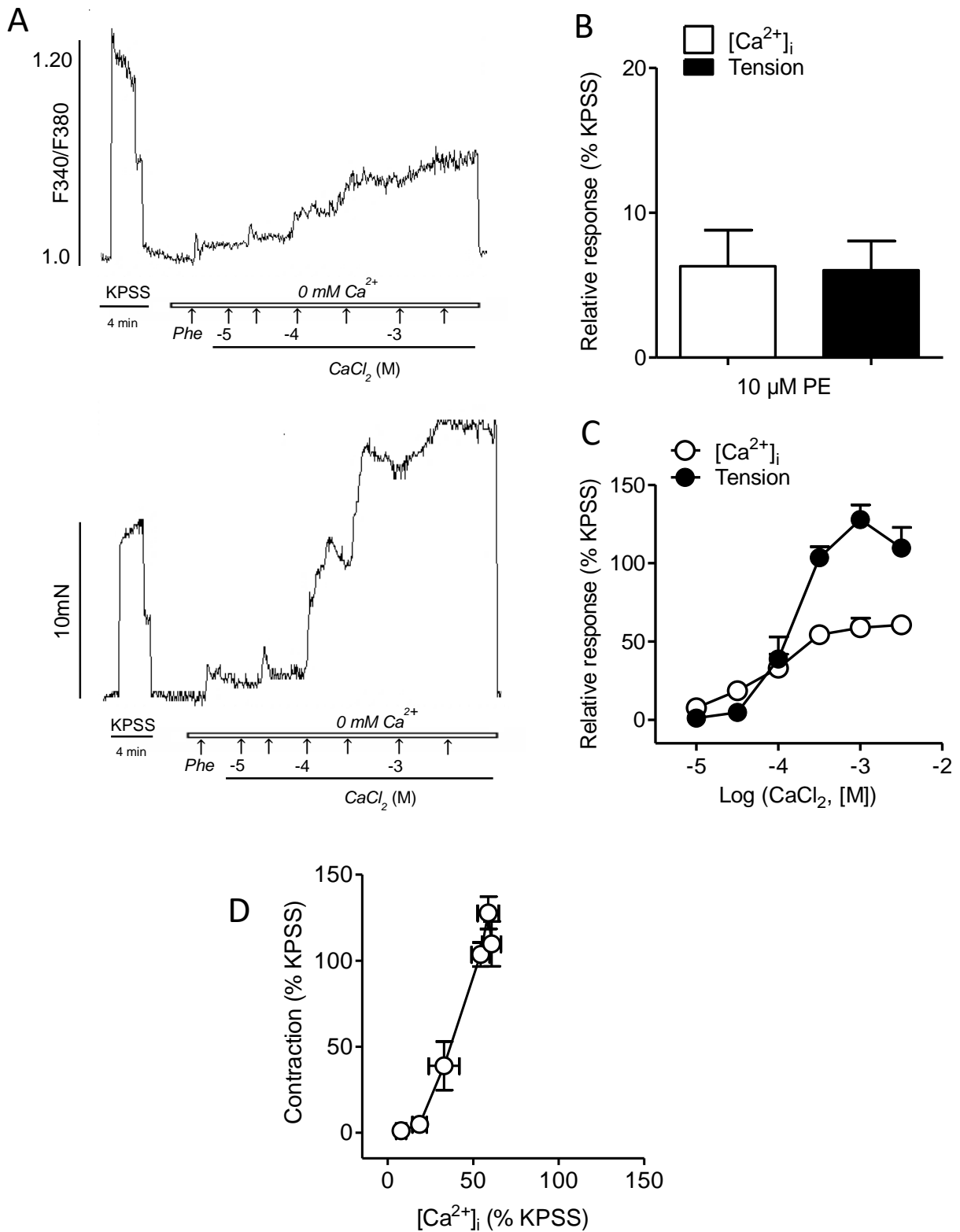


Figura 1. La activación del receptor α_1 -adrenérgico participa en la movilización del Ca^{2+} intracelular, la entrada de Ca^{2+} , y la sensibilización del Ca^{2+} asociada a la contracción.

(A) Registro que muestra los cambios tanto en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (registro superior) como en la vasoconstricción (registro inferior) inducidos por la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos tras una dosis única de Phe (10 μM) y posterior realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio en un medio libre de Ca^{2+} (PSS^0).

Resultados

(B, C) Los datos muestran los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la vasoconstricción inducidos tras la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares en respuesta a la adición de una dosis única de Phe (10 μ M) (B) en arterias mesentéricas en PSS⁰ y tras realizar una CCR de $CaCl_2$ (desde 10 μ M a 10 mM) después de una estimulación previa con Phe (10 μ M) (C). (D) Representación gráfica de la relación entre los cambios producidos en la $[Ca^{2+}]_i$ y la tensión en respuesta a la CCR de $CaCl_2$ realizada en arterias estimuladas con Phe en un medio libre de Ca^{2+} . Las respuestas de los vasos se encuentran expresadas como valores absolutos de $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta F_{340}/F_{380}$) o de la tensión (Nm^{-1}) (A) o como valores relativos a la respuesta máxima obtenida con KPSS (B, C, D). Los valores representan las medias \pm SEM de n=7 arterias (una procedente de cada animal).

Tabla 1. Efecto del bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L, nifedipina (30 nM), del inhibidor de la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1, Pyr6 (3 μ M), y del tratamiento combinado del inhibidor de la bomba SERCA, CPA (10 μ M), junto al inhibidor de la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1, Pyr6 (3 μ M), sobre la sensibilidad y la respuesta máxima de las curvas concentración-respuesta para el $CaCl_2$ en arterias de resistencia mesentéricas estimuladas con Phe (10 μ M) en PSS⁰.

	Tension (Nm^{-1})		
	pEC ₅₀	E _{max}	n
Control	4.08 \pm 0.03	5.66 \pm 0.49	6
+ Nifedipina	2.93 \pm 0.06***	3.46 \pm 0.40***	6
Control	4.18 \pm 0.05	5.32 \pm 0.94	7
+ Pyr6	3.90 \pm 0.06***	5.31 \pm 0.83	7
Control	3.99 \pm 0.07	6.43 \pm 0.51	8
+ CPA+Pyr6	3.56 \pm 0.07**	5.92 \pm 0.34	8

Los datos representan las medias \pm SEM de un número “n” de arterias (una por cada animal). Los resultados se expresan como valores absolutos de tensión (Nm^{-1}). pEC₅₀ es $-\log(EC_{50})$, siendo EC₅₀ la concentración de agonista que produce un 50% de la respuesta o efecto máximo (E_{max}). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la *t* de Student pareado. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs control.

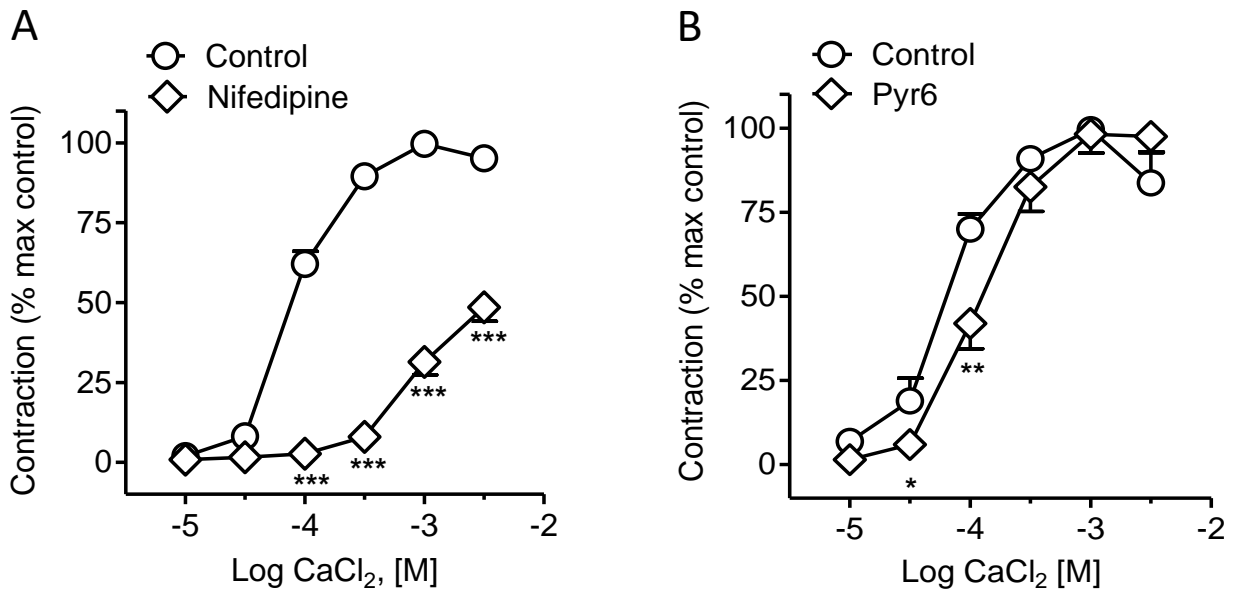


Figura 2. La vasoconstricción inducida por la activación del receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia se debe en gran parte a la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L. **(A, B)** Efectos inhibitorios del bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L, nifedipina, (0.3 μM) **(A)** y del inhibidor de la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1, Pyr6, (3 μM) **(B)** sobre las CCR de CaCl_2 en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio, en PSS^0 y estimuladas con Phe (10 μM). Las respuestas de los vasos se encuentran expresadas como porcentaje de la respuesta máxima del control **(A, B)**. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=6$ arterias (una procedente de cada animal). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control. Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la t de Student pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs control.

Resultados

El efecto de la depleción de los almacenes de Ca^{2+} del RS por el tratamiento con un inhibidor de la SERCA, CPA (10 μM), fue estudiado mediante los cambios producidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la contracción inducidos por Phe (10 μM), en arterias mantenidas en PSS^0 y posteriormente activadas con una dosis única de CaCl_2 (1 mM) (**Figuras 3A, B**)

El tratamiento con CPA disminuyó la movilización del Ca^{2+} intracelular y la contracción fásica pero indujo una reducción menos acusada de la entrada de Ca^{2+} y de la vasoconstricción inducida por activación del receptor α_1 -adrenérgico. Dicha contracción fue prácticamente inhibida en su totalidad tras combinar el tratamiento con CPA y el tratamiento con nifedipina (**Figuras 3A, B**), y se vio ampliamente reducida al combinar los tratamientos con CPA y Pyr6 (**Figura 3C; Tabla 1**). Estos resultados demuestran que la vasoconstricción α_1 -adrenérgica se debe en gran parte a un flujo de Ca^{2+} extracelular a través de los canales VOC tipo-L y en menor medida a la liberación de Ca^{2+} del RS y de la entrada SOC.

Resultados

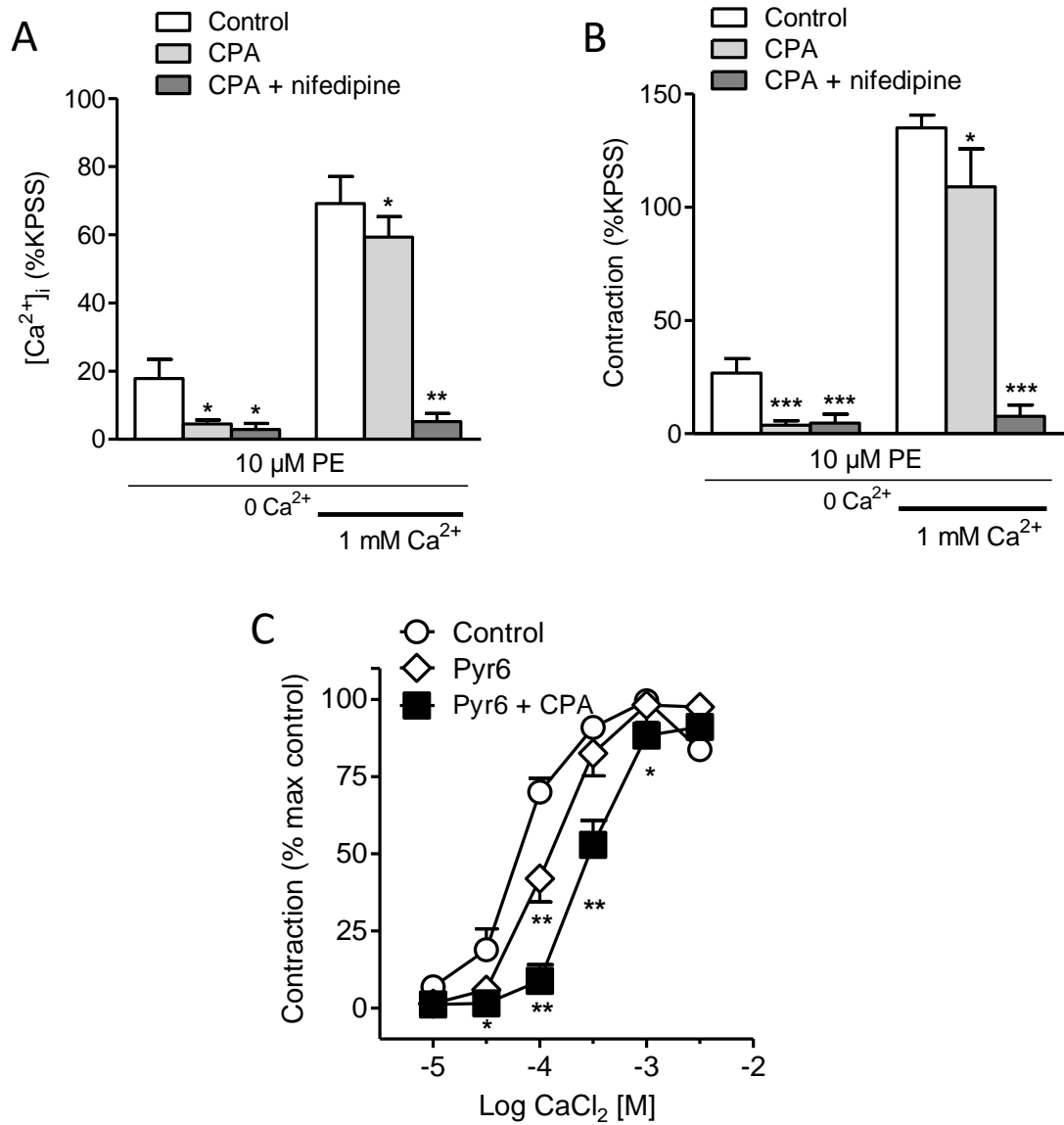


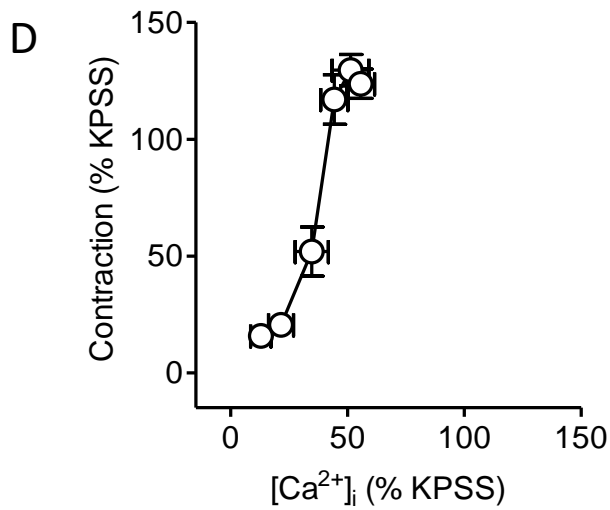
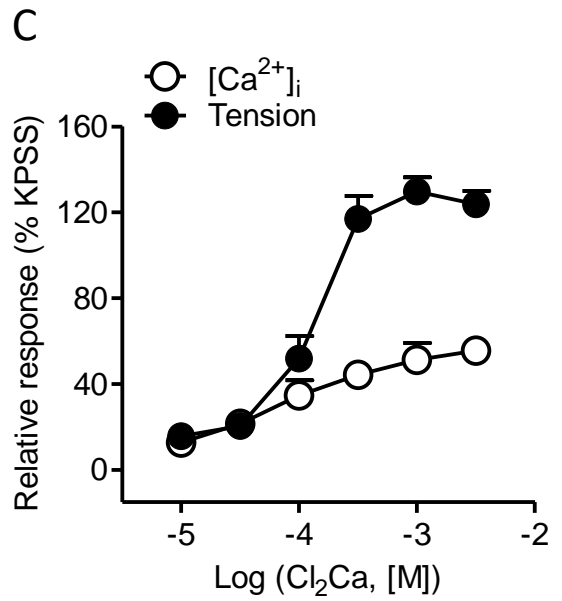
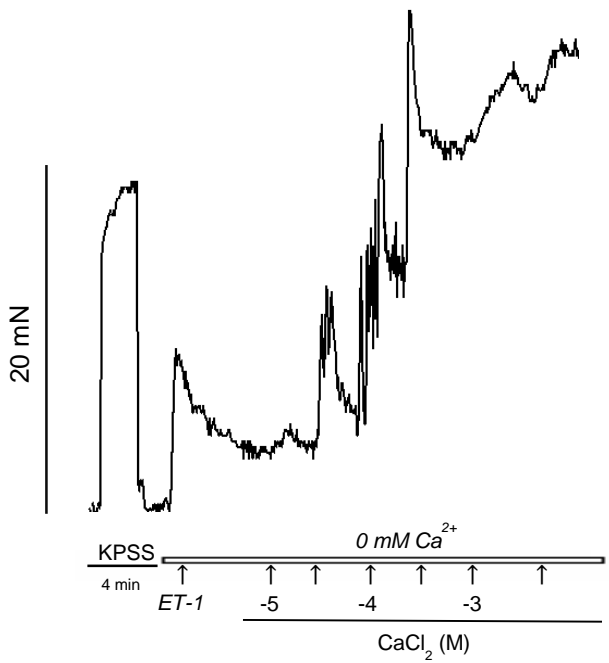
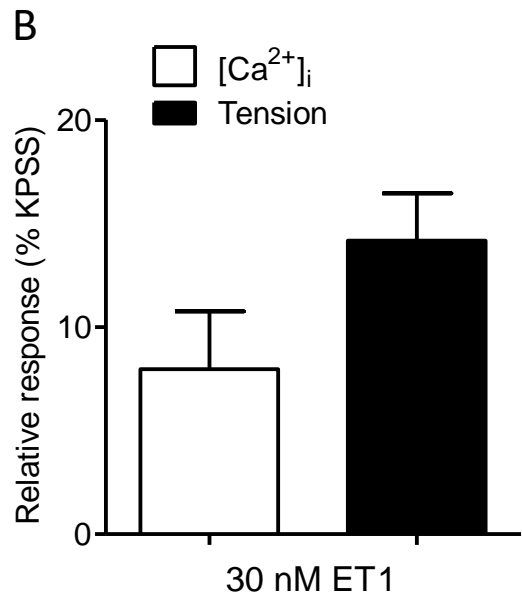
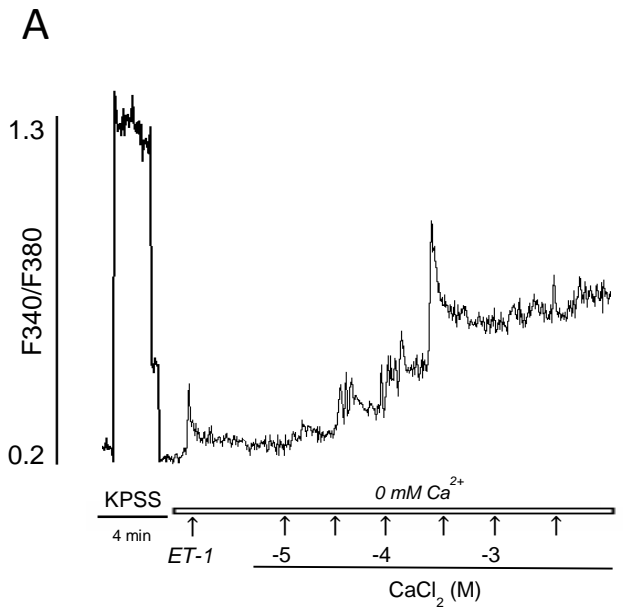
Figura 3. La vasoconstricción inducida por la activación del receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia está mediada por la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y la activación de canales de Ca^{2+} operados por almacén. (A, B) Los datos representados muestran los efectos de la depleción de los depósitos de Ca^{2+} del RS tras la inhibición de la SERCA con CPA (10 μM), tras el tratamiento conjunto de CPA y del bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L nifedipina (0.3 μM) (A, B) sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en la tensión (B) en arterias de resistencia mantenidas en PSS^0 , en respuesta a 10 μM de Phe así como a una dosis 1 mM de Ca^{2+} . También se muestra el efecto sobre la tensión del inhibidor de la entrada SOC, Pyr6 (3 μM), y del efecto combinado del inhibidor Pyr6 (3 μM) y CPA (10 μM) (C) sobre la CCR de CaCl_2 en arterias de resistencia mesentéricas en PSS^0 activadas previamente con Phe (10 μM). Las respuestas de los vasos se encuentran expresadas como valores relativos a la respuesta obtenida con KPSS (A, B) o a la respuesta máxima del control (C). Los valores representan las medias \pm SEM de $n=6$ arterias (una procedente de cada animal). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la t de Student pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs control.

1.2. Mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor de ET en arterias de resistencia

Con el fin de estudiar los procesos de entrada y movilización de Ca^{2+} en arterias de resistencia acoplados al receptor de ET, se usaron arterias mesentéricas desprovistas de endotelio y mantenidas en PSS^0 . Después, los vasos fueron activados con ET-1 (30 nM) (**Figuras 4A, B**) y seguidamente estimulados con concentraciones crecientes de Ca^{2+} (desde 10 μM hasta 10 mM) (**Figuras 4A, C, D**). La adición de ET-1 produjo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y una vasoconstricción simultánea de tipo fásico (**Figura 4B**). Esto último indica que, al igual que la Phe, la ET-1 activa mecanismos de movilización de Ca^{2+} intracelular. Asimismo, también se originó un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (**Figura 4A**) favoreciendo la vasoconstricción de las arterias tras la re-adición de Ca^{2+} , siendo indicativo de que se produce un influjo de Ca^{2+} desde el exterior que se encuentra asociado a la contracción (**Figura 4C**).

En cuanto a la movilización inicial del Ca^{2+} intracelular inducida por ET-1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni en la contracción asociada. Sin embargo, al adicionar Ca^{2+} al medio se produjo un mayor incremento de la vasoconstricción inducido por ET-1 comparado con el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que acompaña a dicha vasoconstricción (**Figura 4C**). Por tanto, esto es indicativo de que tiene lugar un proceso de sensibilización al Ca^{2+} mediado por ET-1, al igual que sucede con el receptor α_1 -adrenérgico. Este proceso se observa mejor al representar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ frente a la tensión, donde se puede apreciar un incremento en la pendiente de la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tensión (**Figura 4D**).

Resultados



Resultados

Figura 4. La activación del receptor de ET produce movilización de Ca^{2+} intracelular, entrada de Ca^{2+} extracelular, y sensibilización al Ca^{2+} asociada a la contracción. (A) Registros que representan los cambios tanto en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (registro superior) como en la vasoconstricción (registro inferior) inducida por la activación de los receptores de ET tras una dosis de ET-1 (30 nM) y posteriormente tras la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio mantenidas en PSS^0 (B) Gráfica que representa los cambios tanto en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como en la vasoconstricción inducidos por la movilización de Ca^{2+} intracelular tras la activación de los receptores de ET tras una dosis de ET-1 (30 nM) (C) Los datos muestran los valores medios de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la vasoconstricción inducidos por adiciones acumulativas de CaCl_2 en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio en PSS^0 y previamente estimuladas con ET-1 (30 nM). (D) Representación gráfica de la relación entre los cambios producidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la vasoconstricción en respuesta a la CCR de CaCl_2 realizada en arterias estimuladas con ET-1 en un medio libre de Ca^{2+} . Las respuestas de los vasos se encuentran expresadas como valores relativos a la respuesta obtenida con KPSS (A, B, C, D). Los valores representan las medias \pm SEM de n=8 arterias (una procedente de cada animal).

Resultados

Debido a que los segmentos arteriales estimulados por segunda vez con una dosis de ET-1 (30 nM) presentan taquifilaxia, es decir, una disminución de la respuesta a un fármaco tras su administración repetida (**Figura 5**), todos los experimentos controles se tuvieron que llevar a cabo en segmentos arteriales diferentes a los utilizados en los tratamientos.

El tratamiento con nifedipina (0.3 μ M), bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L, inhibió de forma significativa la CCR para el CaCl_2 en arterias sin endotelio previamente activadas con ET-1 (30 nM) y mantenidas en PSS^0 (**Figura 6A; Tabla 2**), mientras que al utilizar el inhibidor de la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1, Pyr6 (3 μ M), se obtuvo una ligera reducción de la CCR para el Ca^{2+} activada por ET-1 (**Figura 6B; Tabla 2**). Por lo tanto, los resultados demuestran que la acción vasoconstrictora de la ET-1 en las arterias de resistencia mesentéricas es debida a la movilización de Ca^{2+} intracelular desde los almacenes del RS y a la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L, y también en gran medida a procesos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil.

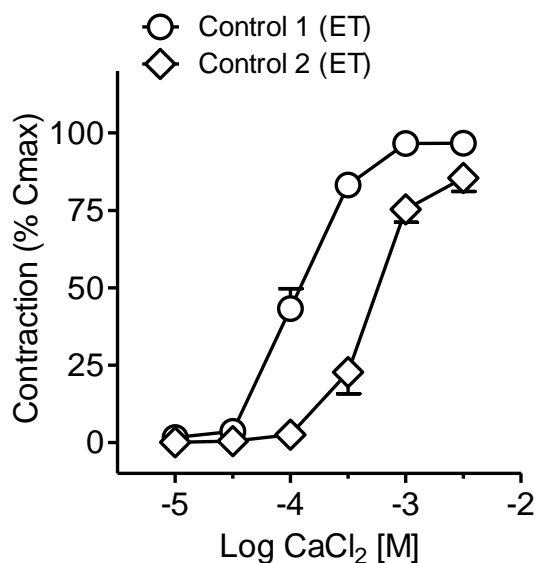


Figura 5. Las arterias de resistencia presentan taquifilaxia tras estimulaciones consecutivas con ET-1. Representación gráfica de dos CCR de CaCl_2 en arterias activadas con ET-1 (30nM) que muestra la disminución de la sensibilidad de los vasos a la ET-1 al realizar una estimulación consecutiva con ET-1 en una segunda CCR, realizada después un intervalo de espera de 1 hora tras la primera CCR, con lavados consecutivos cada 15 minutos. Las respuestas de los vasos se expresan como valores relativos a la respuesta máxima obtenida en la primera curva control. Los valores representan las medias \pm SEM de n=6 arterias (una procedente de cada animal).

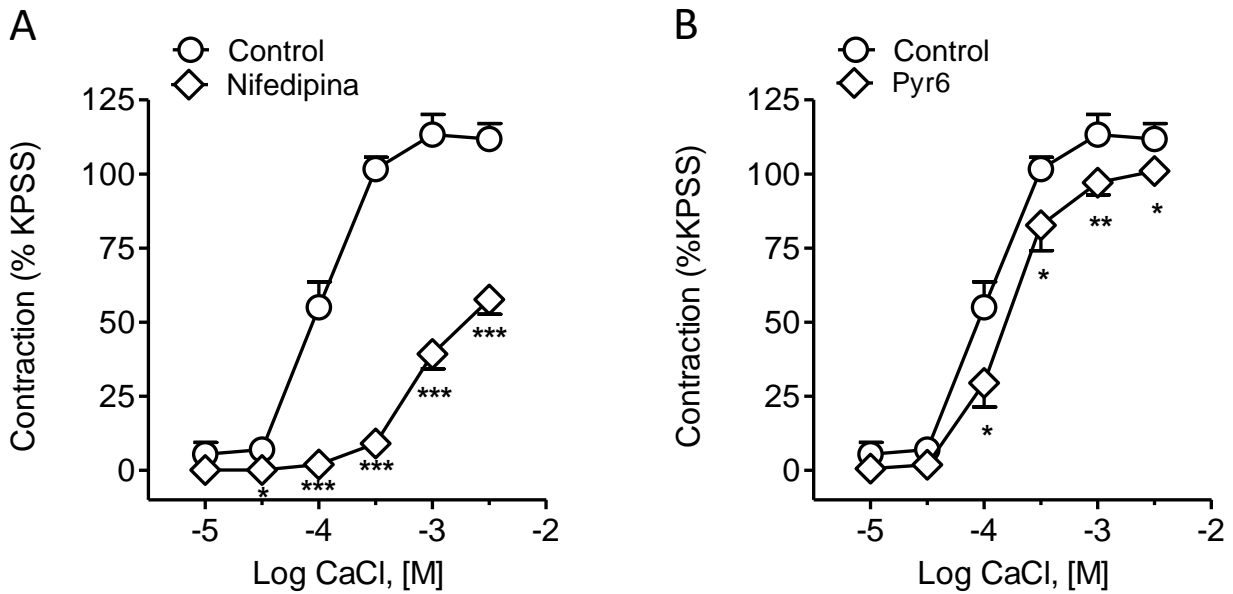


Figura 6. La vasoconstricción inducida por la activación del receptor de ET en arterias de resistencia es mayormente debida a la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L. (A, B) Efectos inhibitorios del bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L, nifedipina ($0.3 \mu\text{M}$) (A), y del inhibidor de la entrada de Ca^{2+} mediada por Orai1, Pyr6 ($3 \mu\text{M}$) (B), sobre las CCR de CaCl_2 en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio, en PSS_0 y previamente estimuladas con ET-1 (30 nM). Los resultados se expresan como valores relativos a la respuesta máxima de la obtenida con KPSS. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=5-6$ arterias (una procedente de cada animal). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la t de Student pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs control.

Resultados

Tabla 2. Efecto del bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L, nifedipina (30 nM), y del inhibidor de la entrada de Ca²⁺ mediada por Orail1, Pyr6 (3 μM), sobre la sensibilidad y la respuesta máxima de las curvas concentración-respuesta para el CaCl₂ en arterias de resistencia mesentéricas estimuladas con ET-1 (30 nM) en PSS⁰.

	Tension (Nm ⁻¹)		
	pEC ₅₀	E _{max}	n
Control	3.93 ± 0.05	4.66 ± 0.50	10
+ Nifedipina	3.11 ± 0.03***	3.47 ± 0.15*	6
Control	3.93 ± 0.05	4.66 ± 0.50	9
+ Pyr6	3.91 ± 0.06	4.18 ± 0.34	8

Los datos representan las medias ± SEM de un número “n” de arterias (una por cada animal). Los resultados se expresan como valores absolutos de tensión (Nm⁻¹). pEC₅₀ es $-\log(\text{EC}_{50})$, siendo EC₅₀ la concentración de agonista que produce un 50% de la respuesta o efecto máximo (E_{max}). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la *t* de Student pareado. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs control.

2. PAPEL DE LA PI3K EN LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA

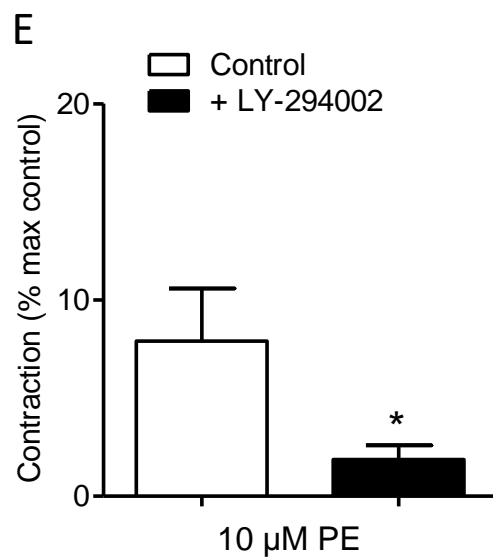
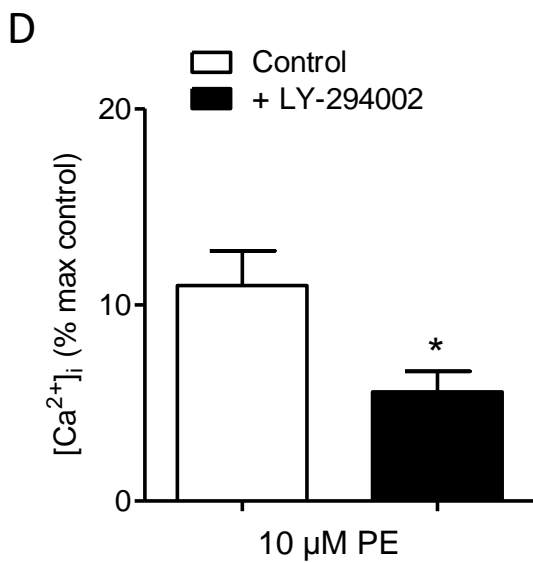
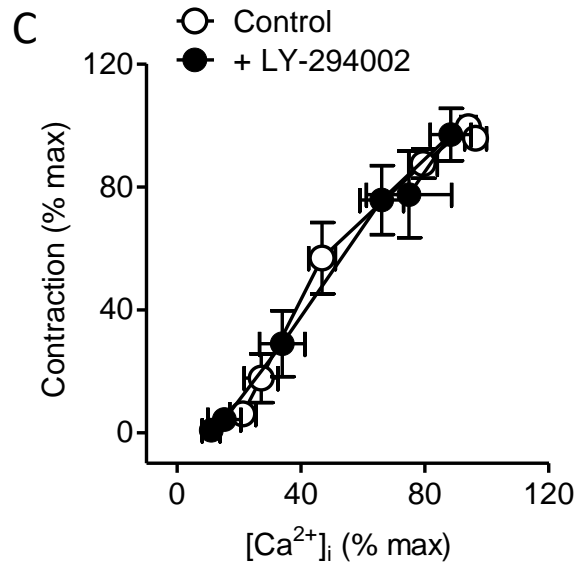
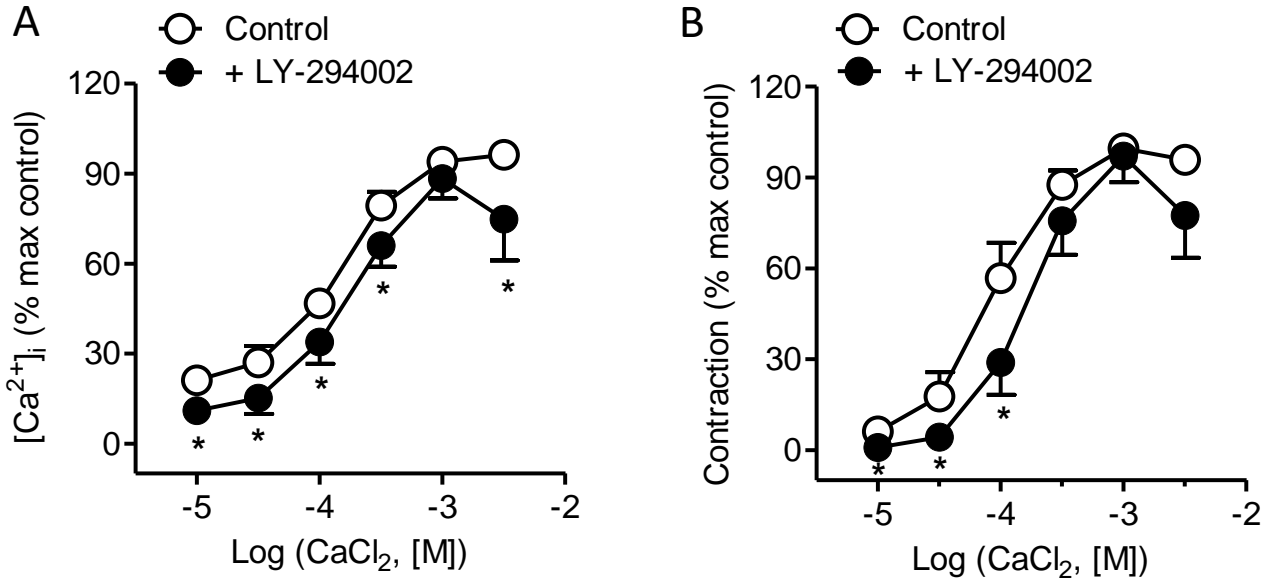
2.1. La inhibición de la PI3K redujo la movilización de Ca^{2+} intracelular y la entrada de Ca^{2+} inducidas por Phe

Los efectos del inhibidor de la PI3K, LY-294002 (3 μ M), sobre los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ y en la contracción acoplados al receptor α_1 -adrenérgico se evaluaron en arterias de resistencia mesentéricas sin endotelio, en PSS⁰ y activadas con Phe (10 μ M), tras lo cual se añadieron concentraciones crecientes de $CaCl_2$ (desde 10 μ M hasta 10 mM) para determinar si la PI3K participa en la entrada de Ca^{2+} , en la movilización del Ca^{2+} o en el proceso de sensibilización al Ca^{2+} acoplados a dicho receptor. Este inhibidor produjo una ligera disminución tanto de la entrada de Ca^{2+} como de la vasoconstricción inducidas por Phe (**Figuras 7A, B; Tabla 3**) pero sin afectar la relación $[Ca^{2+}]_i$ -tensión para este agonista. Esto sugiere que la PI3K no está implicada en los procesos sensibilización al Ca^{2+} (**Figura 7C**). Es interesante destacar que la inhibición de la PI3K también redujo la movilización de Ca^{2+} intracelular y la contracción asociada a dicha movilización (**Figuras 7D, E**).

2.2. La inhibición de la isoforma PI3K δ redujo la vasoconstricción acoplada al receptor α_1 -adrenérgico

También fue evaluada la implicación de la isoforma δ de la PI3K sobre la vasoconstricción α_1 -adrenérgica, utilizando un inhibidor específico para dicha isoforma, el IC-87114 (3 μ M). El tratamiento con este inhibidor redujo la contracción inducida por Phe ($pEC_{50}=3.73 \pm 0.07$; $E_{max}=5.12 \pm 0.20$ *control* vs $pEC_{50}= 3.71 \pm 0.04$; $E_{max}= 4.73^{***} \pm 0.36$ $p < 0.001$ *tratamiento*). Los datos representan las medias \pm SEM de un “n”=6 arterias, cada una procedente de un animal) (**Figura 8**).

Resultados



Resultados

Figura 7. La inhibición de la PI3K reduce la entrada de Ca^{2+} , la vasoconstricción y la movilización de Ca^{2+} intracelular vía activación del receptor α_1 -adrenérgico. (A, B) Los datos muestran los efectos del inhibidor de la PI3K, LY-294002 (3 μM), sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en la vasoconstricción (B) provocados por la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio, en PSS^0 y estimuladas con Phe (10 μM). (C, D, E) Efecto del inhibidor LY-294002 sobre la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tensión en respuesta a Phe (10 μM) en arterias de resistencia mesentéricas (C) y sobre los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (D) y la tensión (E) producidos por la movilización del Ca^{2+} intracelular tras la activación de las arterias con Phe (10 μM) en PSS^0 . Las respuestas se encuentran expresadas como porcentaje de la respuesta máxima del control. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=8$ arterias (una procedente de cada animal). * $P < 0.05$ vs control.

Tabla 3. Efecto de los inhibidores de la PI3K, LY-294002 (3 μM); ERK-MAPK, PD-98059 (3 μM); y PKC, GF-109203X (0.1 μM), sobre la sensibilidad y la respuesta máxima de las curvas concentración-respuesta para el CaCl_2 en arterias de resistencia mesentéricas estimuladas con Phe (10 μM) en PSS^0 .

	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ (F ₃₄₀ /F ₃₈₀)			Tension (Nm ⁻¹)		
	pEC ₅₀	E _{max}	n	pEC ₅₀	E _{max}	n
Control	3.77 \pm 0.06	0.34 \pm 0.04	7	4.12 \pm 0.09	4.73 \pm 0.47	7
+ LY-294002	3.86 \pm 0.04	0.25 \pm 0.03*	7	3.79 \pm 0.09**	4.81 \pm 0.61	7
Control	3.85 \pm 0.08	0.42 \pm 0.06	7	3.78 \pm 0.06	4.36 \pm 0.33	7
+ PD-98059	3.71 \pm 0.17	0.23 \pm 0.06***	7	3.73 \pm 0.24	4.24 \pm 0.32	7
Control	3.96 \pm 0.10	0.33 \pm 0.04	8	3.91 \pm 0.12	5.97 \pm 0.63	8
+ GF-109203X	3.90 \pm 0.13	0.25 \pm 0.04*	8	3.93 \pm 0.14	4.81 \pm 0.69**	8

Los datos representan las medias \pm SEM de un número “n” de arterias (una por cada animal). Los resultados se expresan como valores absolutos, como el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ratio F₃₄₀/F₃₈₀) y tensión (Nm⁻¹). pEC₅₀ es $-\log(\text{EC}_{50})$, siendo EC₅₀ la concentración de agonista que produce un 50% de la respuesta o efecto máximo (E_{max}). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la *t* de Student pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs control.

Resultados

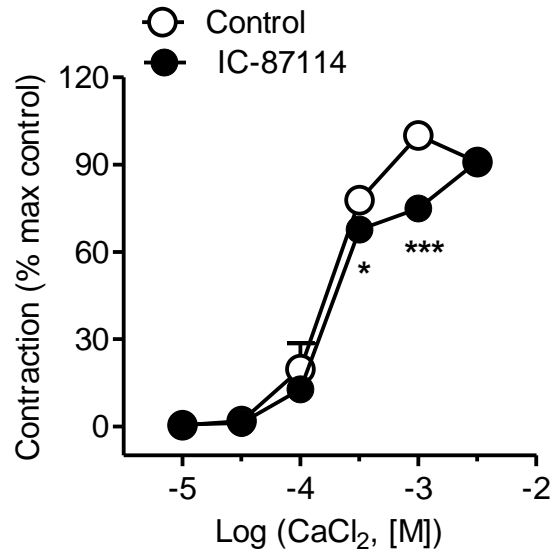


Figura 8. La inhibición de la isoforma PI3K δ provoca una reducción de la vasoconstricción tras la activación del receptor α_1 -adrenérgico. Efecto del inhibidor específico de la isoforma δ de la PI3K, IC-87114 (3 μ M), sobre los cambios producidos en la vasoconstricción por la realización de una CCR de CaCl₂ (desde 10 μ M a 10 mM) en arterias mesentéricas sin endotelio, en PSS₀ y tras su activación con Phe (10 μ M) (**Figura 8**). Las respuestas se encuentran expresadas como porcentaje de la respuesta máxima del control. Los valores representan las medias \pm SEM de n=6 arterias (una procedente de cada animal). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 vs control.

2.3. La inhibición de la PI3K redujo la movilización de Ca^{2+} sin afectar a la contracción asociada ni a la entrada de Ca^{2+} inducidas por ET-1

Para estudiar los efectos de la PI3K sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión acoplados al receptor de ET en vasos de resistencia se usó un inhibidor de la PI3K, LY-294002 (3 μM), en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio y en PSS⁰. Las arterias fueron activadas previamente con ET-1 (30 nM), tras lo cual se realizaron CCR para el Ca^{2+} (desde 10 μM hasta 10 mM).

Tras el tratamiento con el inhibidor de la PI3K no se observaron diferencias en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni en la contracción inducidas por Ca^{2+} en arterias activadas con ET-1 en relación a los controles (**Figuras 9A, B; Tabla 4**). En cuanto al efecto sobre la movilización del Ca^{2+} intracelular, tras el tratamiento con LY-294002 se produjo una marcada reducción de la movilización del Ca^{2+} intracelular pero no se observó ninguna variación significativa en la contracción asociada (**Figuras 9C, D**).

Resultados

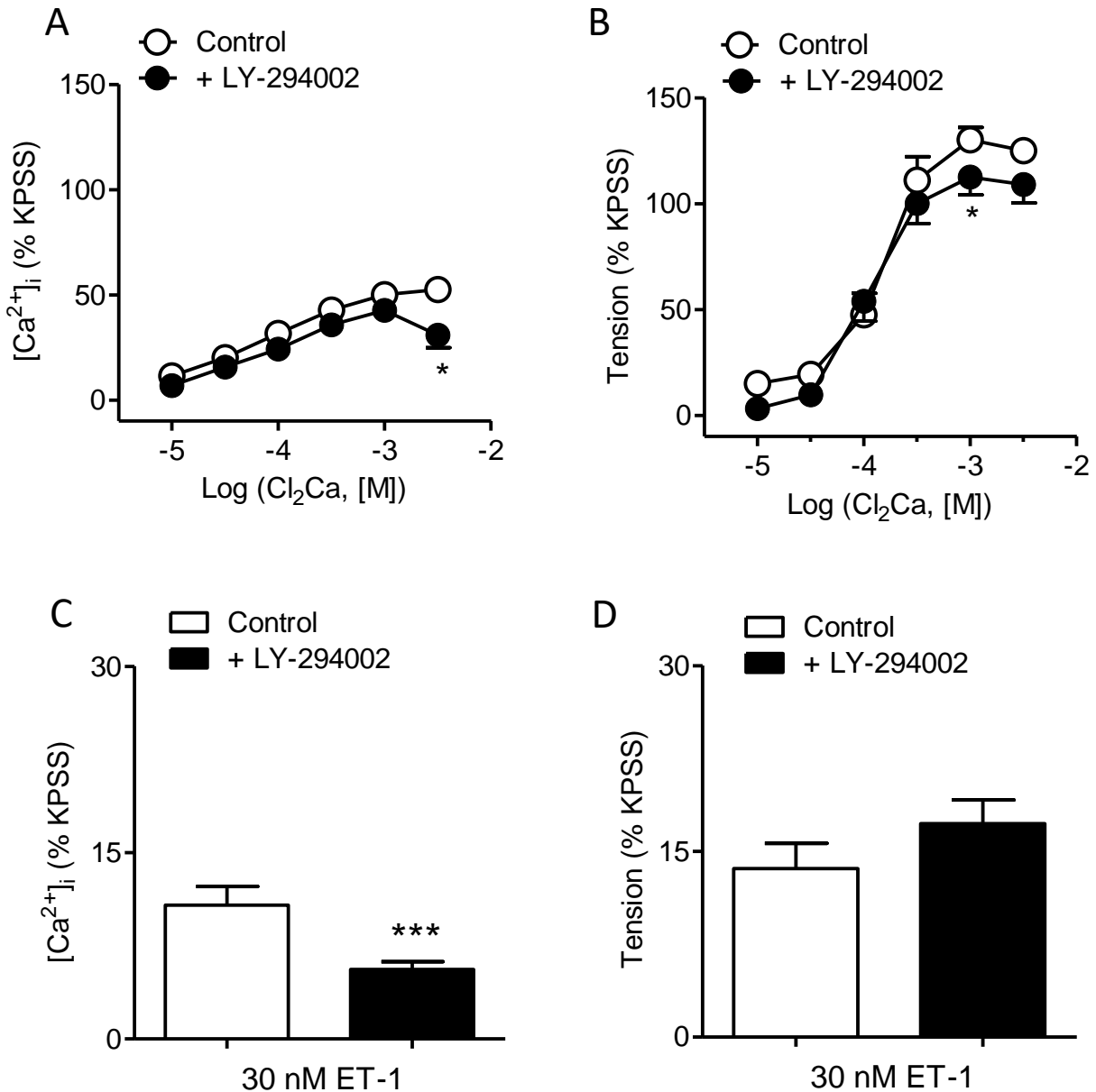


Figura 9. La inhibición de la PI3K no afectó de forma significativa a la entrada de Ca²⁺ ni a la vasoconstricción, pero redujo de forma importante la movilización de Ca²⁺ intracelular tras la activación del receptor de ET. (A, B, C) Los datos muestran los efectos del inhibidor de la PI3K, LY-294002 (3 μM), sobre los cambios en la [Ca²⁺]_i (A) y en la vasoconstricción (B) provocadas por la realización de una CCR de CaCl₂ (desde 10 μM a 10 mM) en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio, en un medio libre de Ca²⁺ y estimuladas con ET-1 (30 nM). (C, D) Efecto del inhibidor LY-294002 sobre la [Ca²⁺]_i (C) y la tensión (D) producidos por la movilización del Ca²⁺ intracelular tras la activación con ET-1 (30 nM) en PSS⁰. Las respuestas se encuentran expresadas como porcentaje de la respuesta máxima de los vasos. Los valores representan las medias ± SEM de n=5 arterias (una procedente de cada animal). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la *t* de Student pareado. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs control.

Resultados

Tabla 4. Efecto de los inhibidores de la PI3K, LY-294002 (3 μ M); de la ERK-MAPK, PD-98059 (3 μ M); y de la PKC, GF-10923X (0.1 μ M), sobre la sensibilidad y la respuesta máxima de las curvas concentración-respuesta para el CaCl₂ en arterias de resistencia mesentéricas estimuladas con ET-1 (30 nM) en PSS⁰.

	[Ca ²⁺] _i (F ₃₄₀ /F ₃₈₀)			Tension (Nm ⁻¹)		
	pEC ₅₀	E _{max}	n	pEC ₅₀	E _{max}	n
Control	4.11 ± 0.17	0.27 ± 0.03	8	3.80 ± 0.08	4.54±0.35	8
+ LY-294002	4.04 ± 0.14	0.17 ± 0.04*	5	3.96 ± 0.07	3.08 ±0.64*	5
+ PD-98059	4.35 ± 0.24	0.32 ± 0.01	4	3.89 ± 0.13	3.69 ± 0.44*	4
+GF-10923X	3.17 ± 0.19**	0.50 ± 0.10*	5	3.40 ± 0.27*	3.43 ± 0.27**	5

Los datos representan las medias ± SEM de un número “n” de arterias (una por cada animal). Los resultados se expresan como valores absolutos, como el incremento en la concentración intracelular de Ca²⁺ [Ca²⁺]_i (ratio F₃₄₀/F₃₈₀) y tensión (Nm⁻¹). pEC₅₀ es -log(EC₅₀), siendo EC₅₀ la concentración de agonista que produce un 50% de la respuesta o efecto máximo (E_{max}). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test t-Student pareado. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs control.

3. PAPEL DE LA MAPK EN LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA

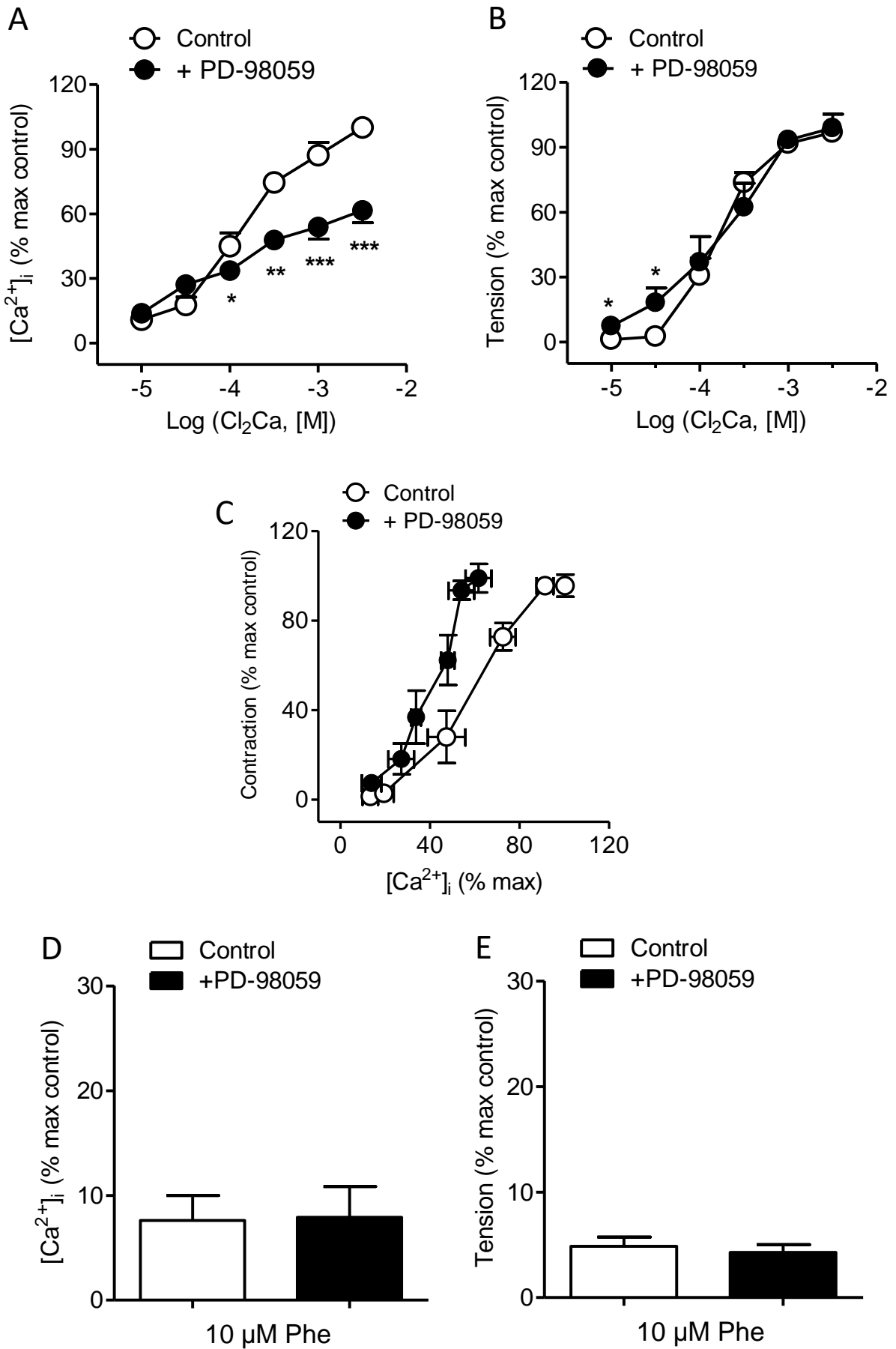
3.1. La inhibición de la ERK-MAPK redujo la entrada de Ca^{2+} pero no la vasoconstricción acoplada al receptor α_1 -adrenérgico

La $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción tras la re-adición de Ca^{2+} en arterias mesentéricas estimuladas con Phe se muestran en la **Figura 10**. El tratamiento con el inhibidor PD-98059 redujo ampliamente el incremento producido sobre la $[Ca^{2+}]_i$ por la Phe (10 μ M) tras la re-adición de concentraciones crecientes de Ca^{2+} (desde 10 μ M hasta 10 mM) (**Figura 10A; Tabla 3**) sin afectar a la vasoconstricción. (**Figura 10B; Tabla 3**). La representación de la relación $[Ca^{2+}]_i$ -tensión fue desplazada hacia la izquierda tras la inhibición de la ERK-MAPK en arterias de resistencia (**Figura 10C**), indicando un incremento de los procesos de sensibilización al Ca^{2+} en condiciones en las que la vía de la ERK-MAPK se encuentra bloqueada, lo que sugiere que dicha cinasa participa en la entrada de Ca^{2+} no asociada a procesos contráctiles. Sin embargo, el tratamiento con PD-98059 no afectó a la movilización de Ca^{2+} intracelular ni a la contracción asociada a la activación α_1 -adrenérgica (**Figuras 10D, E**).

3.2. La inhibición de la p38-MAPK no afectó a la vasoconstricción acoplada al receptor α_1 -adrenérgico

Con el fin de confirmar la falta de implicación de otras cinasas de la familia MAPK en la vasoconstricción de las arterias de resistencia, también se evaluaron los efectos del inhibidor de la p38-MAPK, SB-239063 (0.3 μ M), sobre la vasoconstricción acoplada al receptor α_1 -adrenérgico tras la re-adición de concentraciones crecientes de Ca^{2+} (desde 10 μ M hasta 10 mM) en arterias mesentéricas previamente activadas con Phe (10 μ M) y mantenidas en PSS₀. El tratamiento con este inhibidor no produjo alteraciones significativas en la tensión, lo que sugiere que esta cinasa no participa en la regulación de la vasoconstricción adrenérgica ($pEC_{50}=4.00 \pm 0.09$; $E_{max}=3.60 \pm 0.44$ *control* vs $pEC_{50}=3.97 \pm 0.07$; $E_{max}=3.54 \pm 0.47$ *tratamiento*) (**Figura 11**).

Resultados



Resultados

Figura 10. La inhibición de la ERK-MAPK disminuyó la entrada de Ca^{2+} sin afectar a la vasoconstricción pero aumentó la sensibilización al Ca^{2+} tras la activación del receptor α_1 -adrenérgico. (A, B, C) Efectos del inhibidor de la ERK-MAPK, PD-98059 (3 μM), sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en la vasoconstricción (B) provocados por la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias mesentéricas sin endotelio, en PSS^0 y tras su activación con Phe (10 μM). (C, D) Efecto del inhibidor PD-98059 sobre la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -contracción tras una dosis de 10 μM Phe en arterias de resistencia mesentéricas (C) y sobre los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (D) y contracción (E) provocados por la movilización del Ca^{2+} intracelular posteriormente a la activación con Phe (10 μM) en PSS^0 . Los resultados se muestran expresados como porcentaje de la respuesta máxima de los controles. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=7$ arterias (una procedente de cada animal). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la t de Student pareado. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs control.

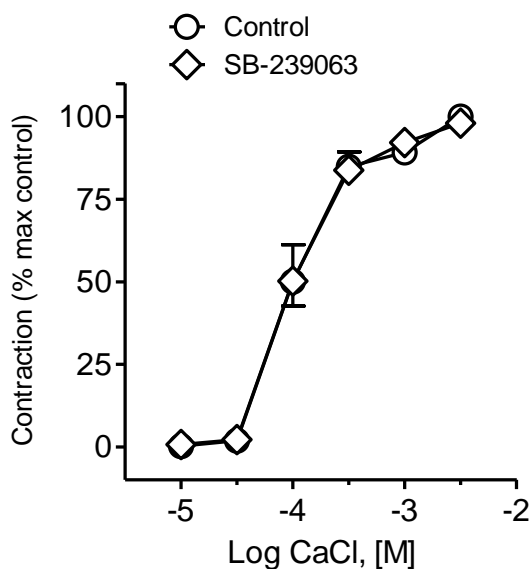


Figura 11. La inhibición de la p38-MAPK no produjo ninguna alteración sobre la vasoconstricción asociada a la activación del receptor α_1 -adrenérgico. Efectos del inhibidor de la p38-MAPK, SB-239063 (0.3 μM), sobre la vasoconstricción acoplada al receptor α_1 -adrenérgico tras la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM hasta 10 mM) en arterias mesentéricas previamente activadas con Phe (10 μM) en PSS^0 (Figura 11). Los resultados se muestran expresados como porcentaje de la respuesta máxima de los controles. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=4-6$ arterias (una procedente de cada animal).

3.3. La inhibición de la ERK-MAPK no afectó a la movilización de Ca^{2+} , a la entrada de Ca^{2+} ni a la vasoconstricción inducidas por la activación del receptor de ET

Los efectos del inhibidor de la ERK-MAPK, PD-98059 (30 μM), sobre las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión acopladas al receptor de ET fueron estudiados en arterias mesentéricas sin endotelio y mantenidas en PSS^0 , tras la adición de Ca^{2+} al medio (desde 10 μM hasta 10 mM) y activadas previamente con ET-1 (30 nM). Una vez inhibida la vía ERK-MAPK, no se apreciaron diferencias en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la tensión respecto a los controles (**Figuras 12A, B; Tabla 4**). Tampoco se observaron diferencias significativas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la tensión provocadas por la movilización de Ca^{2+} intracelular (**Figuras 12C, D**), lo que indica que la ERK-MAPK no participa en la regulación de la entrada de Ca^{2+} en el MLV acoplada al receptor ET, a diferencia del receptor α_1 -adrenérgico.

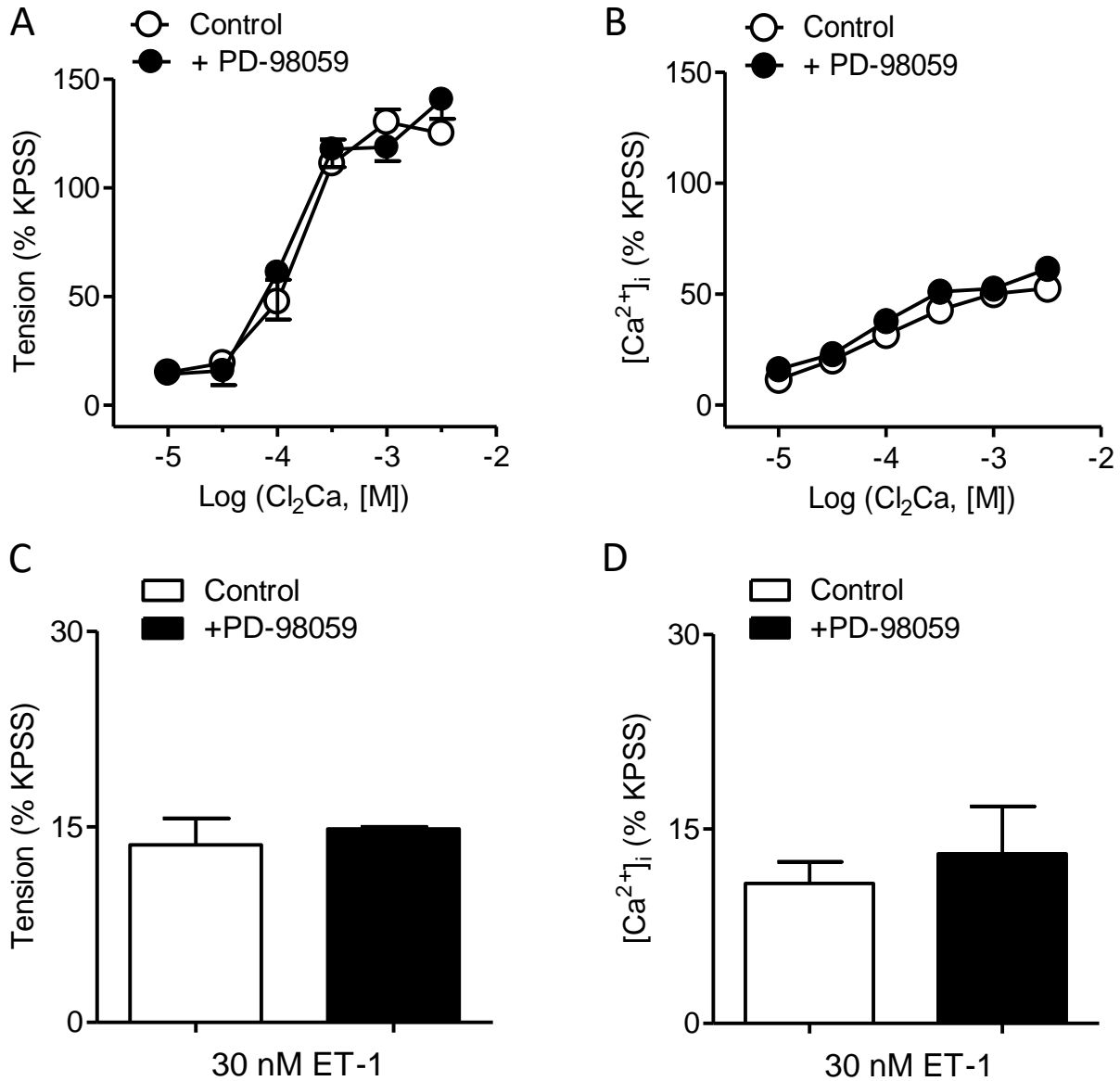


Figura 12. La inhibición de la ERK-MAPK no afectó a la entrada de Ca²⁺ ni a la vasoconstricción acoplada a la activación del receptor de ET. (A, B) Efectos del inhibidor de la ERK-MAPK, PD-98059 (3 μ M) sobre los cambios en la [Ca²⁺]_i (A) y en la vasoconstricción (B) provocados por la realización de una CCR de CaCl₂ (desde 10 μ M a 10 mM) en arterias mesentéricas sin endotelio, en PSS₀ y tras su activación con ET-1 (30 nM) (C, D). Efecto del inhibidor PD-98059 sobre los incrementos en la [Ca²⁺]_i (C) y tensión (D) provocados por la movilización del Ca²⁺ intracelular tras la activación de las arterias con ET-1 en PSS₀. Los resultados se expresan como valores relativos a la respuesta máxima de la obtenida con KPSS. Los valores representan las medias \pm SEM de n=4 arterias (una procedente de cada animal).

4. PAPEL DE LA PKC EN LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE Ca^{2+} ACOPLADOS A RECEPTOR EN ARTERIAS DE RESISTENCIA

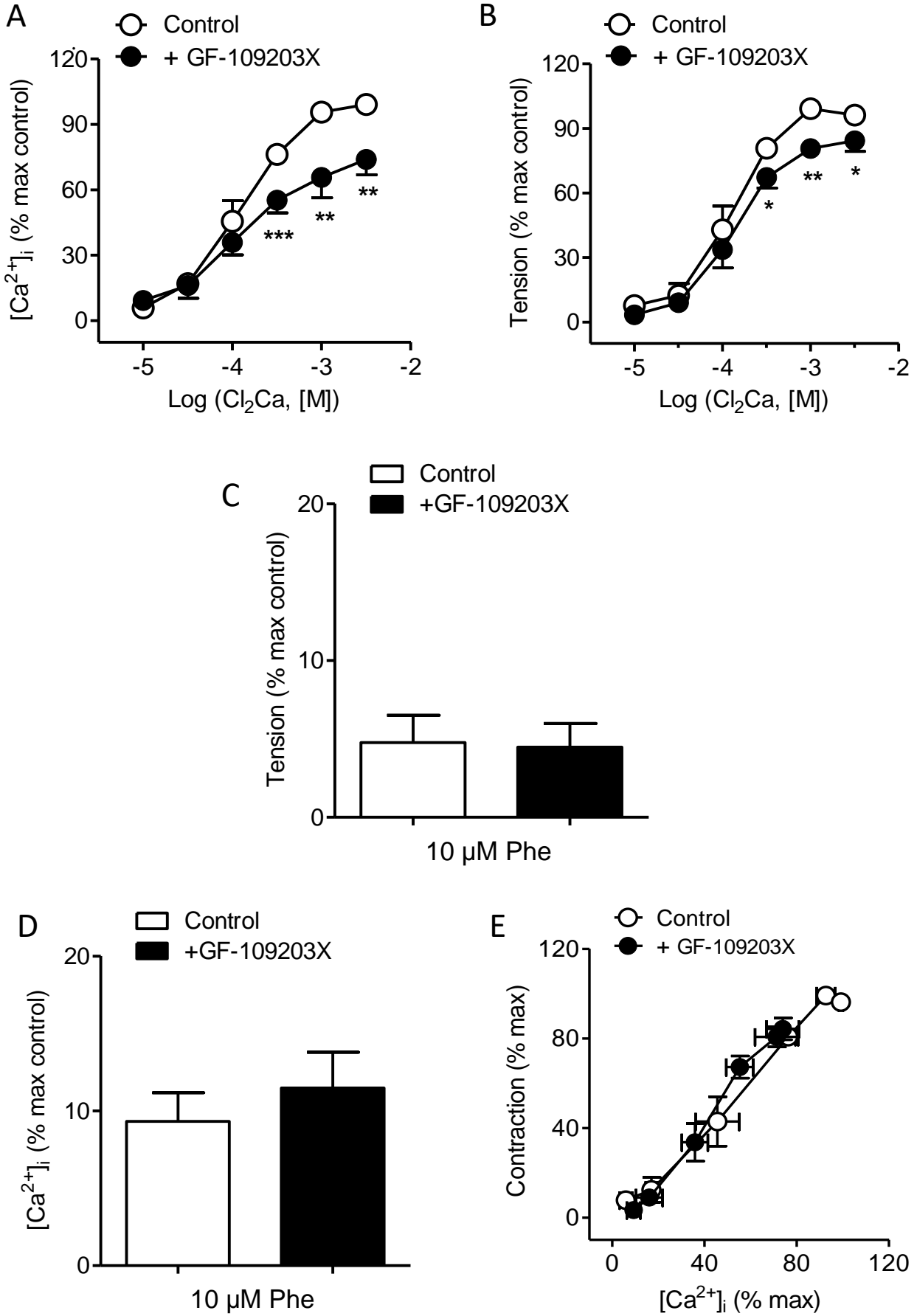
4.1. La inhibición de la PKC redujo la entrada de Ca^{2+} y en menor medida la contracción inducida por Phe

El inhibidor de la PKC, GF-109203X (0.1 μ M), se utilizó para evaluar la participación de la PKC en la regulación del Ca^{2+} acoplada al receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia mesentéricas. El tratamiento con dicho inhibidor redujo los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ y en menor medida la vasoconstricción inducida por la adición de concentraciones crecientes de Ca^{2+} (desde 10 μ M hasta 10 mM) en arterias previamente estimuladas con Phe (10 μ M) y mantenidas en PSS⁰ (**Figuras 13A, B; Tabla 3**). Tanto la sensibilización al Ca^{2+} (**Figura 13C**) como la movilización de Ca^{2+} intracelular inducida por Phe permanecieron inalteradas tras la inhibición de la PKC (**Figura 13D, E**).

4.2. La inhibición de la PKC redujo la entrada de Ca^{2+} y la vasoconstricción acopladas al receptor de ET

Los efectos del inhibidor de la PKC, GF-109203X (0.1 μ M), sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción acopladas al receptor de ET se estudiaron en arterias de resistencia mesentéricas desprovistas de endotelio, en PSS⁰ y activadas con ET-1 (30 nM), tras lo cual se añadieron concentraciones crecientes de $CaCl_2$ (desde 10 μ M hasta 10 mM). Este inhibidor provocó una disminución de la entrada de Ca^{2+} así como una marcada reducción de la vasoconstricción inducidas por ET-1 (**Figuras 14A, B; Tabla 4**), ocasionando un desplazamiento a la derecha de la relación $[Ca^{2+}]_i$ -tensión. Esto sugiere que la inhibición de la PKC reduce de forma significativa los procesos de sensibilización al Ca^{2+} acoplados a vías de señalización dependientes de la activación del receptor de ET (**Figura 14C**). Es importante remarcar que la inhibición de la PKC provocó un incremento de la movilización de Ca^{2+} intracelular pero no de la contracción física asociada a dicha movilización (**Figuras 14D, E**).

Resultados



Resultados

Figura 13. La inhibición de la PKC redujo la entrada de Ca^{2+} sin afectar a la sensibilización al Ca^{2+} tras la activación del receptor α_1 -adrenérgico. (A, B) Los datos muestran los efectos del inhibidor de la PKC, GF-109203X (0.1 μM) sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en la vasoconstricción (B) provocados por la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio, en PSS⁰ y estimuladas con 10 μM Phe. (C, D, E) Efecto del inhibidor GF-109203X sobre la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -vasoconstricción en respuesta a 10 μM Phe en arterias de resistencia mesentéricas (C) y sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (D) y la contracción (E) inducidos por la movilización del Ca^{2+} intracelular tras la activación de los vasos con Phe (10 μM) en PSS⁰. Las respuestas se expresan como porcentaje de la respuesta máxima del control. Los valores representan las medias \pm SEM de n=7 arterias (una procedente de cada animal). Las diferencias estadísticamente significativas fueron analizadas mediante un test de la *t* de Student pareado. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs control.

Resultados

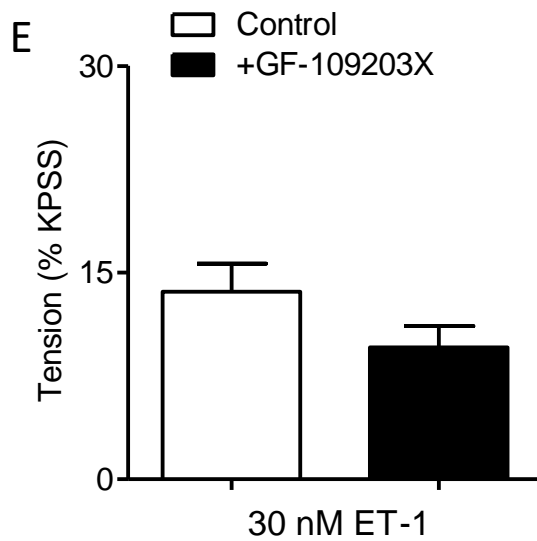
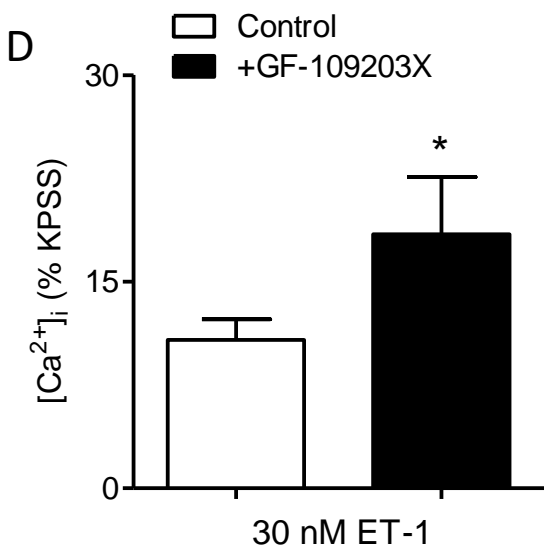
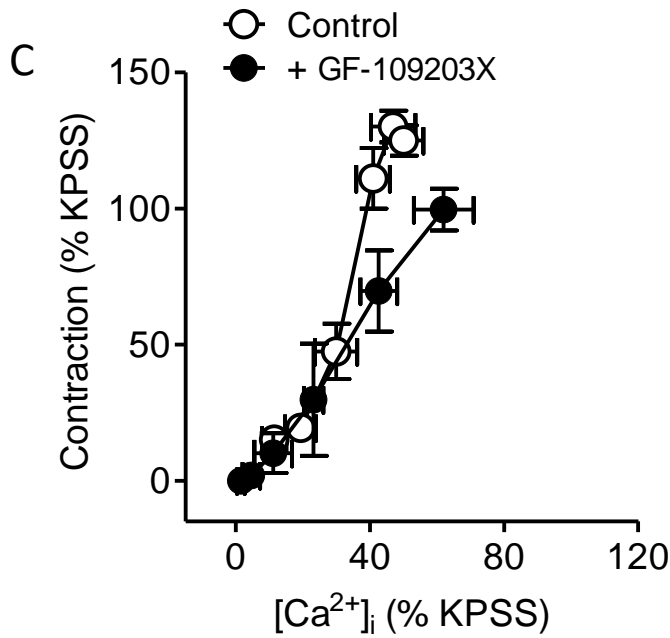
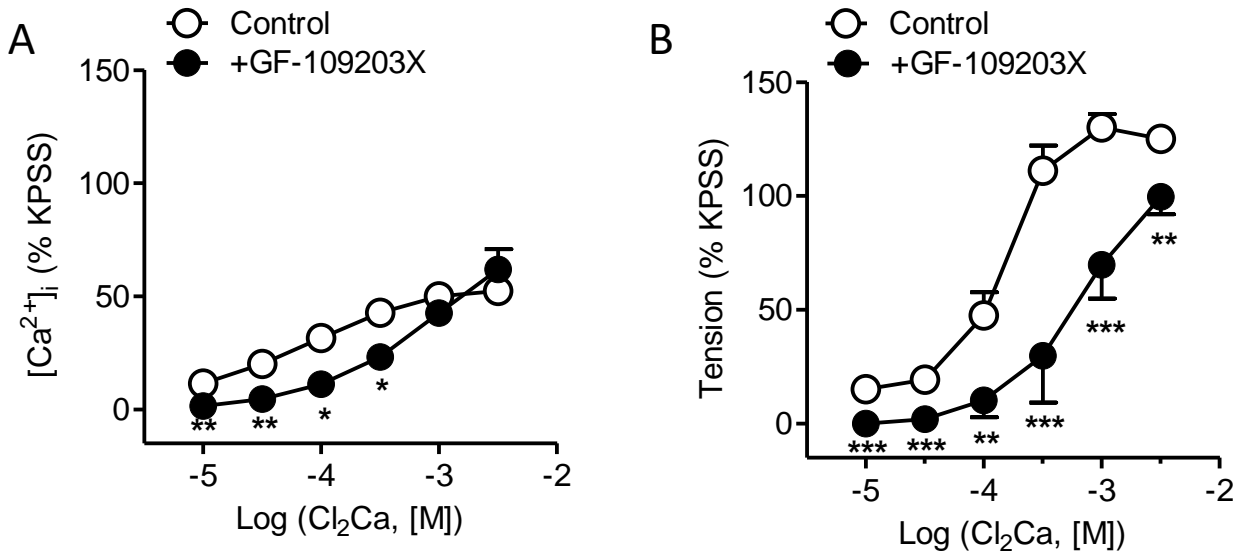


Figura 14. La inhibición de la PKC disminuyó la entrada de Ca^{2+} y la vasoconstricción reduciendo también la sensibilización al Ca^{2+} tras la activación del receptor de ET. (A, B) Los datos muestran los efectos del inhibidor de la PKC, GF-109203X (0.1 μM) sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (A) y en la vasoconstricción (B) provocados por la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias mesentéricas desprovistas de endotelio, en PSS^0 y estimuladas con ET-1 (30 nM). (C, D, E) Efecto del inhibidor GF-109203X sobre la relación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -vasoconstricción en respuesta a 30 nM ET-1 en arterias de resistencia mesentéricas (C) y sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (D) y la contracción (E) inducidos por la movilización del Ca^{2+} intracelular tras la activación de los vasos con ET-1 (30 nM) en PSS^0 . Los resultados se expresan como valores relativos a la respuesta máxima de la obtenida con KPSS. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=7$ arterias (una procedente de cada animal). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

5. MECANISMOS DE MODULACIÓN DE LA ENTRADA DE Ca^{2+} REGULADOS POR CINASAS EN ARTERIAS DE RESISTENCIA

5.1. La inhibición de la ERK-MAPK, PI3K y PKC redujo la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L

Con el fin de evaluar si la PI3K, ERK-MAPK y PKC modulan la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VOC tipo-L en arterias de resistencia mesentéricas, los efectos de los inhibidores de tales cinasas, LY-294002 (3 μ M), PD-98059 (3 μ M) y GF-109203X (0.1 μ M) respectivamente, fueron estudiados sobre la variación de la $[Ca^{2+}]_i$ y la vasoconstricción producidas tras una despolarización con KPSS y en la vasoconstricción inducida tras la re-adición de Ca^{2+} (desde 10 μ M hasta 10 mM) en arterias despolarizadas con KPSS⁰. El tratamiento con los inhibidores de las tres cinasas redujo de forma acentuada la entrada de Ca^{2+} (**Figuras 15A, C, E**) y la contracción asociada (**Figuras 15B, D, F**) tras la estimulación con KPSS, sugiriendo que estas cinasas participan en la modulación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L en arterias de resistencia mesentéricas.

5.1.1. La inhibición de la isoforma PI3K δ redujo la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L

Para evaluar si la isoforma δ de la PI3K participa en la modulación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L en arterias de resistencia mesentéricas, el efecto del inhibidor específico de esa isoforma, IC-87114 (3 μ M), fue estudiado sobre la contracción inducida tras la re-adición de Ca^{2+} (desde 10 μ M hasta 10 mM) en arterias despolarizadas con KPSS⁰. El tratamiento con IC-78114 reprodujo los efectos del inhibidor general de la PI3K LY-294002, reduciendo de forma significativa la vasoconstricción provocada por la entrada de Ca^{2+} en arterias despolarizadas (**Figura 16**), lo que sugiere que la isoforma PI3K δ también participa en la regulación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L en arterias de resistencia mesentéricas ($pEC_{50} = 3.33 \pm 0.04$; $E_{max} = 4.19 \pm 0.28$ control vs $pEC_{50} = 3.21 \pm 0.04$; $E_{max} = 2.97^{***} \pm 0.22$ tratamiento). $***P < 0.001$ vs control.

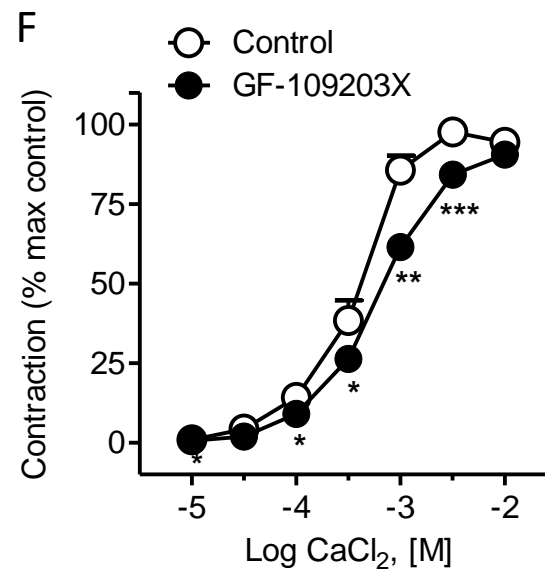
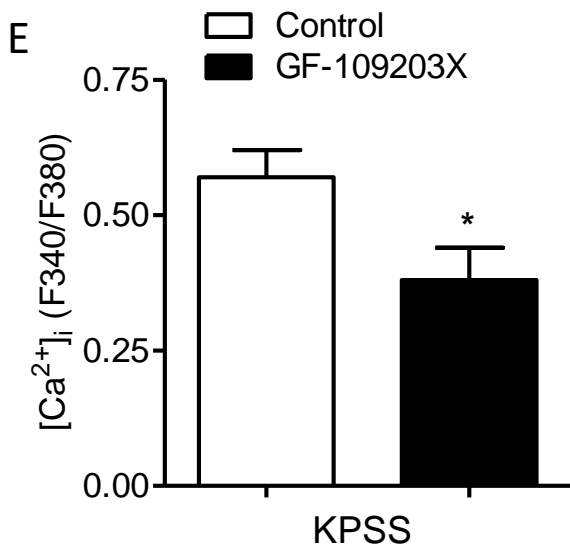
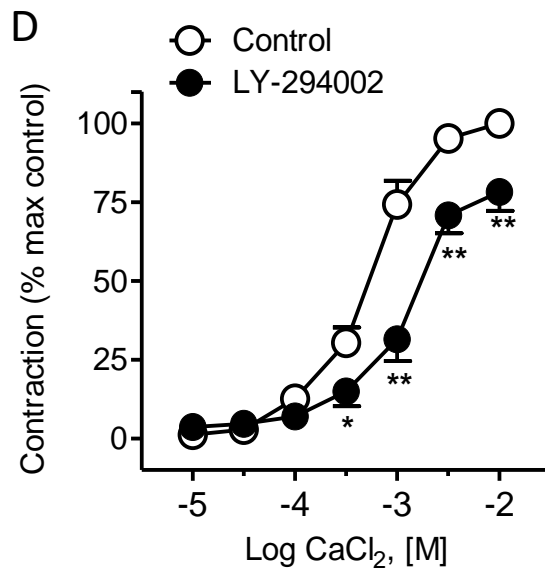
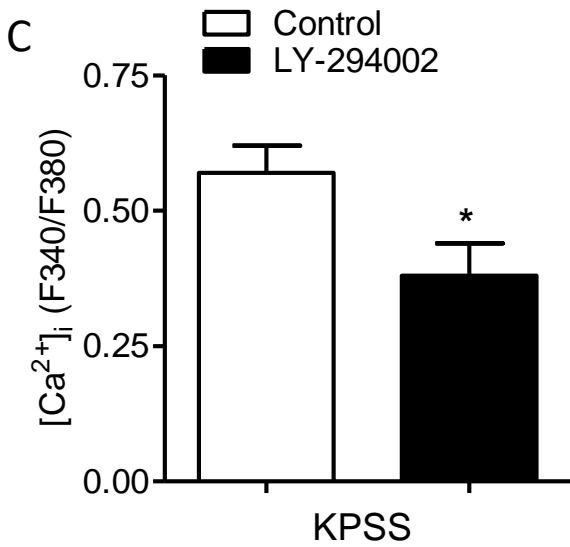
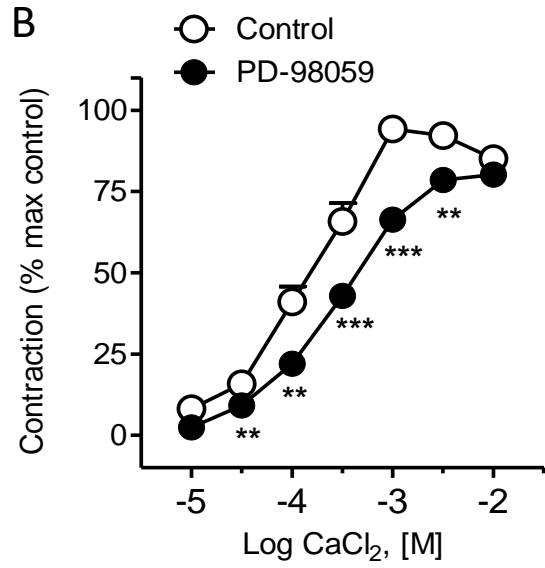
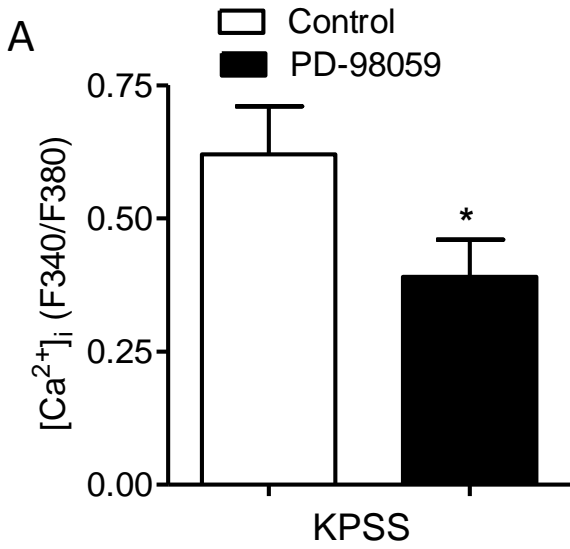


Figura 15. Los inhibidores de las cinasas ERK-MAPK, PI3K y PKC reducen la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L. (A-F) En esta figura se muestran los efectos de los inhibidores de la ERK-MAPK, PD-98059 (3 μM) (A, B), de la PI3K, LY-294002 (3 μM) (C, D), y de la PKC, GF-109203X (0.1 μM) (E, F), sobre el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desencadenado por la despolarización con una solución rica en K^+ (KPSS, 120 mM) (A,C,E) y la vasoconstricción en respuesta a la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias desprovistas de endotelio, mantenidas en PSS_0 y activadas con KPSS_0 (B, D, F). Los resultados se encuentran expresados como valores absolutos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta\text{F}_{340}/\text{F}_{380}$) (A, C, E) o como valores relativos a la respuesta máxima de los controles. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=5-8$ arterias (una procedente de cada animal). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

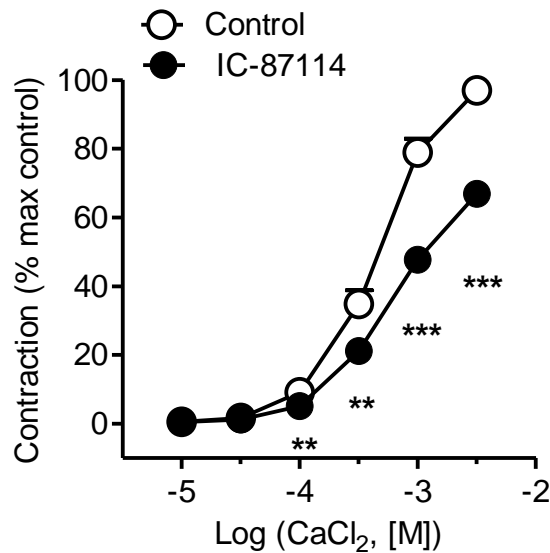


Figura 16. La inhibición de la isoforma PI3K δ disminuye la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L. Efecto del inhibidor de la isoforma δ de la PI3K, IC-87114 (3 μM), sobre la vasoconstricción en respuesta a la realización de una CCR de CaCl_2 (desde 10 μM a 10 mM) en arterias sin endotelio, mantenidas en PSS_0 y activadas con KPSS_0 . Las respuestas se encuentran expresadas como porcentaje de la respuesta máxima del control. Los valores representan las medias \pm SEM de $n=8$ arterias (una procedente de cada animal). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control.

5.2. La inhibición de las vías de la ERK-MAPK, PI3K y PKC redujo la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L independientemente del receptor de rianodina (RyR)

La CICR mediada por los RyR tras la activación de los canales VOC tipo-L ha sido recientemente descrita en el MLV de arterias de resistencia mesentéricas (Sánchez *et al.*, 2018), y por lo tanto, hemos estudiado la potencial relación que puede haber entre las vías de señalización de la PI3K, PKC y MAPK, y el mecanismo CICR mediado por RyR. Se realizó un tratamiento con rianodina (10 μM) para bloquear de forma selectiva el RyR (Meissner, 2017) y la consecuente movilización de Ca^{2+} desde el RS y la amplificación de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L. Dicho tratamiento redujo los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la contracción sensibles a nifedipina tras la re-adición de Ca^{2+} en arterias desprovistas de endotelio y despolarizadas previamente con K^+ (**Figuras 17A, B**), confirmando el proceso de CICR tras la activación de los canales VOC tipo-L. Por otro lado, en las arterias tratadas con rianodina para bloquear el proceso de CICR, la inhibición selectiva de la MAPK con PD-98059 (**Figuras 18A, B**), PI3K con LY-294002 (**Figura 18C**) o PKC con GF-109203X (**Figure 18D**), redujo los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pero no en la contracción inducida por la re-adición de Ca^{2+} en arterias despolarizadas con K^+ , lo que indica un efecto de estimulación directo de la MAPK, PI3K y PKC sobre los canales VOC tipo-L de forma independiente a los mecanismos del RyR.

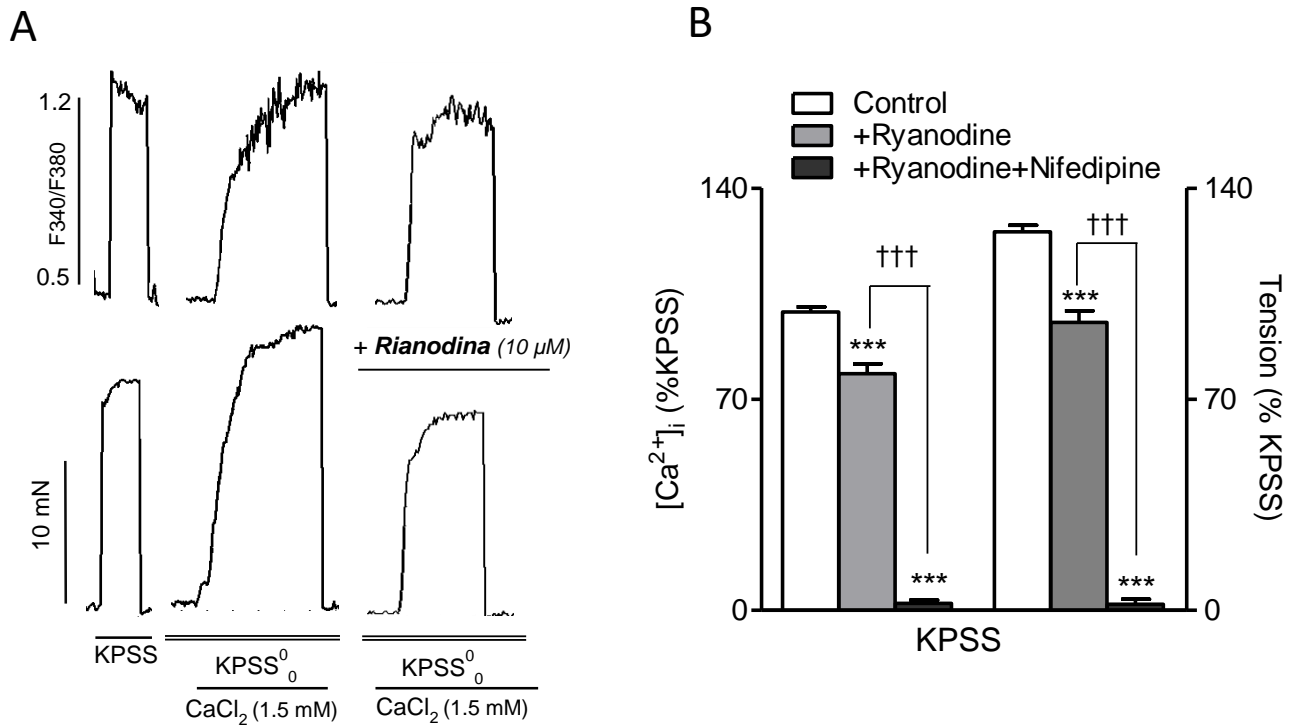


Figura 17. El tratamiento con rianodina reduce una parte significativa de la movilización de Ca^{2+} intracelular y la vasoconstricción provocadas por la activación de los canales VOC tipo-L.

(A) Representación de los efectos del tratamiento con rianodina ($10 \mu\text{M}$) sobre los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (registro superior) y en la vasoconstricción (registro inferior) inducidos por re-adición de una dosis de CaCl_2 (1.5 mM) en arterias desprovistas de endotelio despolarizadas con KPSS^0 . (B) Los datos muestran los efectos de la rianodina ($10 \mu\text{M}$) sobre los cambios en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y en la vasoconstricción inducidos por re-adición de una dosis de CaCl_2 (1.5 mM) en presencia y ausencia del bloqueante de los canales VOC tipo-L nifedipina en arterias desprovistas de endotelio despolarizadas con KPSS^0 . Los valores representan las medias \pm SEM de $n=5$ arterias (una procedente de cada animal). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante un test de la t de Student pareado o un one-way ANOVA. * $P < 0.05$ vs control. ††† $P < 0.001$ vs tratamientos con rianodina.

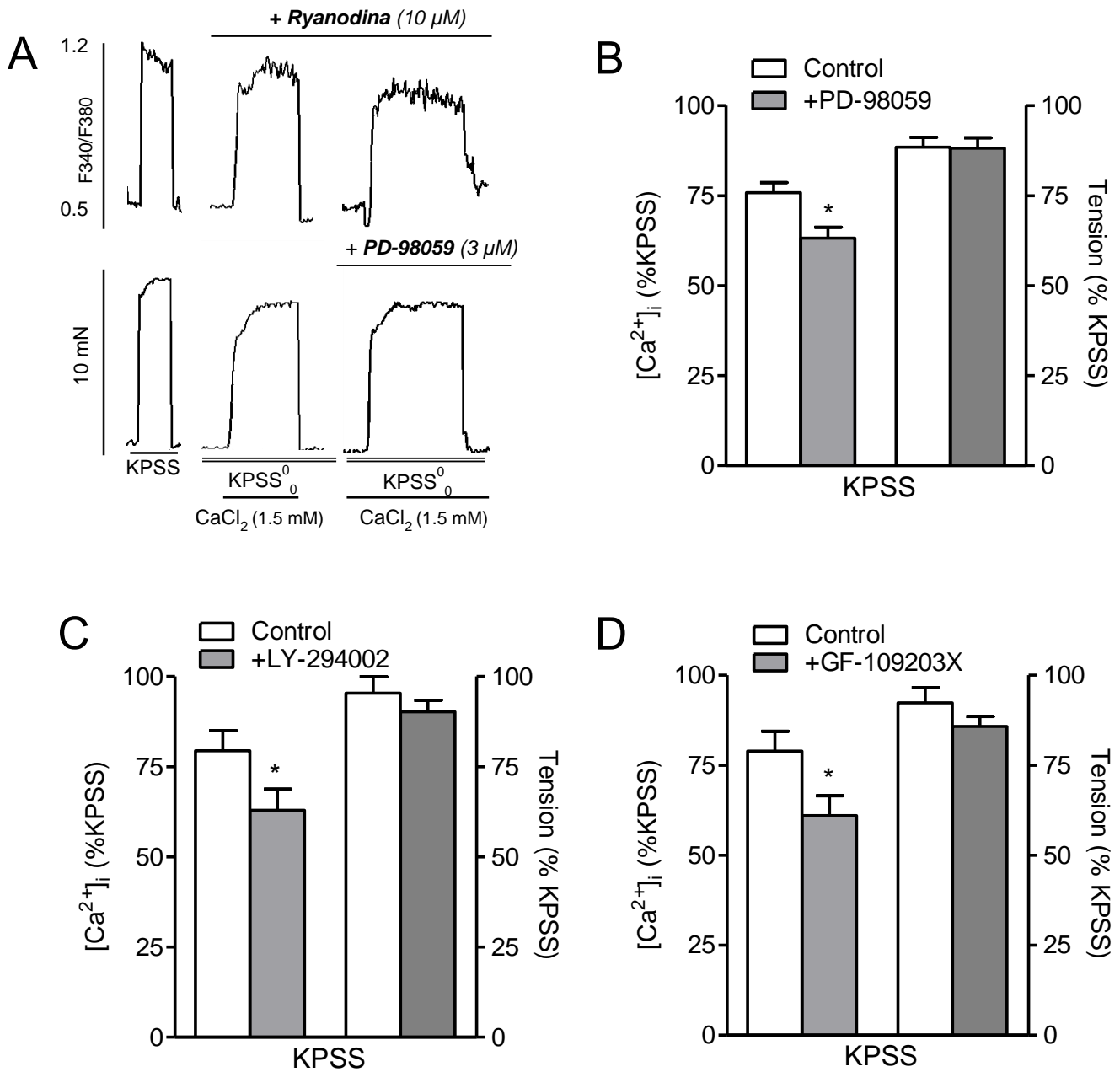


Figura 18. Los inhibidores de la ERK-MAPK, PI3K y PKC reducen la movilización de Ca²⁺ intracelular provocada por la activación de los canales VOC tipo-L independientemente del mecanismo de liberación de Ca²⁺ mediada por el RyR. (A) Representación de los efectos de la inhibición de la MAPK con PD-98059 (3 μM) sobre los cambios en la [Ca²⁺]_i (registro superior) y en la vasoconstricción (registro inferior) inducidas por re-adición de una dosis de CaCl₂ (1.5 mM) en arterias desprovistas de endotelio despolarizadas con KPSS⁰ y tratadas con rianodina (10 μM) para bloquear el RyR. (B) Datos que muestran los efectos del inhibidor PD-98059 (3 μM) sobre los cambios en [Ca²⁺]_i y en la vasoconstricción inducidos por re-adición de una dosis de CaCl₂ (1.5 mM) en arterias desprovistas de endotelio despolarizadas con KPSS⁰ y tratadas con rianodina (10 μM). (C, D) Efectos del inhibidor de la PI3K, LY-294002 (3 μM) (C), y el inhibidor de la PKC, GF-109203X (0.1 μM) (D), sobre los cambios en la [Ca²⁺]_i y en la vasoconstricción inducidos por la re-

Resultados

adición de una dosis de CaCl_2 (1.5 mM) en arterias desprovistas de endotelio despolarizadas con KPSS^0 y en condiciones de bloqueo del RyR con rianodina (10 μM). Los resultados se encuentran expresados como valores absolutos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta F_{340}/F_{380}$) o tensión (Nm^{-1}) (**A**) o como valores relativos a la respuesta máxima obtenida a la despolarización con KPSS (**B, C, D**). Los valores representan las medias \pm SEM de $n=5$ arterias (una procedente de cada animal). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control. Las diferencias significativas fueron analizadas mediante un test de la t de Student pareado o un one-way ANOVA. * $P < 0.05$ vs control. ††† $P < 0.001$ vs tratamiento con rianodina.



VII. DISCUSIÓN

Discusión

La evidencia experimental obtenida durante la última década apoya el papel clave de la regulación del metabolismo del Ca^{2+} por proteínas cinasas en miocitos arteriales y cardiacos, ya sea mediante fosforilación de canales que regulan la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana citoplasmática o mediante la movilización de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares del RS. El presente estudio proporciona nuevos datos sobre la modulación de la regulación del Ca^{2+} a través de las vías de la PI3K, MAPK y PKC acopladas al receptor α_1 -adrenérgico y al receptor de ET en arterias de resistencia, asociadas a procesos tanto contráctiles como no contráctiles. Los resultados obtenidos confirman también la importancia de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo-L así como de los procesos de sensibilización al Ca^{2+} en la vasoconstricción de arterias de pequeño calibre, acoplados tanto al receptor α_1 -adrenérgico como al receptor de ET-1, si bien las cinasas PI3K, MAPK y PKC muestran una contribución diferente en las vías de señalización de Ca^{2+} en función del tipo de receptor.

La hipertensión y la vasoconstricción aumentadas que se asocian con las enfermedades metabólicas como la diabetes, la obesidad o el síndrome metabólico, han sido tradicionalmente atribuidas a los procesos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil del MLV mediados por proteínas cinasas, lo que conlleva un incremento del tono vascular y de la resistencia vascular sistémica (Martínez *et al.*, 2000; Naik *et al.*, 2006; Villalba *et al.*, 2007, 2011; Crestani *et al.*, 2017). Sin embargo, la contribución relativa de los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} y de movilización del Ca^{2+} intracelular a la vasoconstricción arterial es dependiente del tamaño del vaso.

Asimismo, la sensibilidad de la vasoconstricción y de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por activación α_1 -adrenérgica a inhibidores farmacológicos de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L, es comparativamente mayor en arterias de resistencia que en arterias de conductancia (Prieto *et al.*, 1991; Martinsen *et al.*, 2012; Kitazawa & Kitazawa, 2012), como confirman los resultados del presente estudio.

Además, se ha descrito que en la contracción de grandes arterias se encuentran implicadas, en mayor o menor medida, diferentes cinasas como la RhoK y la PKC, mientras que la vasoconstricción de arterias de resistencia parece estar mediada exclusivamente por la PKC (Budzyn *et al.*, 2006; Kitazawa & Kitazawa, 2012).

Por otro lado, también ha sido ampliamente descrito que la ET-1 producida por las células endoteliales es responsable del mantenimiento del tono vascular al difundir a través de la pared vascular y unirse a los receptores ET_A y ET_B en las CMLV, produciendo una potente vasoconstricción (Wagner *et al.*, 1992). Clásicamente se ha descrito a los receptores ET_A presentes en las CMLV como mediadores de procesos vasoconstrictores, mientras que los ET_B, aunque también presentes en el MLV, son predominantes en las células endoteliales vasculares y se encuentran mayormente asociados a procesos de vasodilatación (Masaki, 2004). No obstante, los receptores de ET que provocan vasodilatación, presumiblemente los ET_B, parecen no estar presentes en segmentos aislados de arterias mesentéricas de rata (Hiley & Poon, 1994). El aumento de la vasoconstricción inducida por ET-1 asociada a diversas patologías vasculares se ha vinculado al receptor ET_A, aunque hay estudios que además implican al receptor ET_B del MLV en la contracción inducida por ET-1 a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (Dong *et al.* 2005; Nilsson *et al.* 2008; Sánchez *et al.*, 2014).

Diversos estudios han descrito que se requiere del influjo de Ca²⁺ extracelular para los procesos de contracción vascular y mitogénesis producidos por ET-1 (Zhang *et al.* 1999; Kawanabe *et al.* 2002a) y esta entrada de Ca²⁺ al MLV inducida por ET-1 y asociada a procesos mitogénicos puede estar incrementada en el curso de la enfermedad metabólica (Contreras *et al.*, 2013). El conocimiento de la regulación de estas vías de señalización y su bloqueo con agentes farmacológicos podría ser de gran ayuda a la hora de tratar situaciones patológicas en las que la ET-1 presenta un papel importante, como la aterosclerosis o la hiperlipidemia.

La activación de arterias mesentéricas desprovistas de endotelio con ET-1 produjo un incremento de la [Ca²⁺]_i además de una vasoconstricción sostenida especialmente a las concentraciones más altas de Ca²⁺, respuestas que presentaron taquifilaxis de las arterias en una segunda estimulación. Estos resultados confirman estudios iniciales donde la administración intravenosa de ET-1 produjo elevación de la presión arterial acompañada de un incremento de la resistencia vascular esplácnica en voluntarios sanos (Wagner *et al.*, 1992). Asimismo, la taquifilaxis de las respuestas a la ET-1 de las arterias de resistencia mesentéricas estaría de acuerdo con la

desensibilización demostrada para el receptor ET_A, responsable de las respuestas de Ca²⁺ en miocitos arteriales mesentéricos de rata (Morris *et al.*, 2010).

El receptor ET_A en el músculo liso arterial es un GPCR asociado a la PLC, y activa mecanismos de movilización de Ca²⁺ intracelular y de entrada de Ca²⁺ a través de canales iónicos. En nuestro estudio, la estimulación de las arterias de resistencia con ET-1 originó un aumento de la [Ca²⁺]_i, favoreciendo la vasoconstricción de las arterias tras la re-adición de Ca²⁺ al medio PSS⁰, siendo indicativo de que además se produce un influjo de Ca²⁺ desde el exterior que se encuentra asociado a la contracción. Esta movilización de Ca²⁺ intracelular como consecuencia de la activación de los receptores de ET ya había sido previamente descrita y de igual modo se debe a la unión del IP₃ a su receptor en la membrana del RS (Chen *et al.*, 2009).

Nuestros resultados también muestran que la adición de Ca²⁺ al medio produjo un mayor incremento de la vasoconstricción inducida por ET-1 en relación al aumento de la [Ca²⁺]_i vinculada a tal vasoconstricción. Este suceso es indicativo de que tiene lugar un proceso de sensibilización al Ca²⁺ mediado por ET-1, hecho que ya fue observado por Nishimura *et al.* (1992) en arterias mesentéricas de conejo y que demostró ser dependiente de GTP, lo que podría indicar un importante papel de los GPCR en este mecanismo.

Por otro lado, el tratamiento con el bloqueante selectivo de los canales VOC tipo-L nifedipina, inhibió de forma significativa la CCR para el CaCl₂ en arterias sin endotelio previamente activadas con ET-1 y mantenidas en PSS⁰, lo que sugiere que la entrada de Ca²⁺ extracelular acoplada a la estimulación del receptor de ET se produce a través de canales VOC tipo-L. Dichos resultados coinciden con los reflejados en otros estudios, en los que los efectos contráctiles de la ET-1 se ven ampliamente reducidos al bloquear los canales VOC tipo-L en un medio libre de Ca²⁺ (Sakata *et al.* 1989; Nyborg *et al.*, 1991; Moumami *et al.* 1992). No obstante, al utilizar el inhibidor de la entrada de Ca²⁺ mediada por Orai1, Pyr6, se obtuvo una ligera reducción de la CCR para el Ca²⁺, lo cual indica que una parte de la acción vasoconstrictora de la ET-1 se debe a la movilización de Ca²⁺ intracelular de los almacenes del RS, aunque la mayor parte se debe a la entrada de Ca²⁺ a través de canales VOC tipo-L.

Discusión

Estos dos mecanismos a través de los cuales la ET-1 provoca incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ ya han sido descritos en el MLV de la tráquea de conejillos de indias y se han asociado a la acción de cada uno de los dos tipos de receptores de ET, respectivamente. Así, la estimulación del receptor ET_A provoca la movilización de Ca^{2+} del RS vía producción de IP_3 y del flujo a través de canales ROC, mientras que la estimulación de los ET_B es el que va a provocar la activación de los canales VOC tipo-L (Inui *et al.* 1999).

Los presentes resultados confirman estudios previos que demuestran la implicación de mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en la vasoconstricción tanto adrenérgica como mediada por ET-1 en arterias de resistencia mesentéricas (Shaw *et al.*, 1997; Buus *et al.*, 1998; Kitazawa & Kitazawa, 2012), pero de forma importante demuestran que las cinasas PI3K, la MAPK y la PKC son partícipes en la regulación de la entrada de Ca^{2+} y en la movilización de Ca^{2+} intracelular acopladas a la activación de los receptores α_1 -adrenérgico y ET_A en arterias de resistencia.

La vía de señalización de la PI3K/Akt es estimulada por la activación del receptor de insulina en el endotelio vascular y se encuentra acoplada a la fosforilación de la eNOS, la producción de NO y la consecuente vasodilatación. En estados de resistencia a la insulina, esta vía se encuentra alterada y asociada a disfunción endotelial (Kim *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2010). Sin embargo, la familia de la PI3K juega un papel esencial en la señalización del Ca^{2+} en neuronas, miocitos cardiacos y vasculares (Viard *et al.*, 2004; Ghigo *et al.*, 2017).

En el MLV, las PI3Ks se encuentran involucradas en la regulación de la entrada de Ca^{2+} tipo-L en respuesta a agentes vasoconstrictores y factores de crecimiento (Macrez *et al.*, 2001; Le Blanc *et al.*, 2004) pero también en el control negativo de la MLCP mediado por Rho Ca^{2+} -dependiente ligado a la sensibilización al Ca^{2+} y a la contracción (Wang *et al.*, 2006). En el presente estudio, la inhibición farmacológica de la PI3K redujo moderadamente tanto la entrada de Ca^{2+} como la vasoconstricción inducidas por Phe en arterias de resistencia, sin afectar la relación Ca^{2+} -tensión para el agonista α_1 -adrenérgico e indicativa de cambios en el proceso de sensibilización al Ca^{2+} .

Estos hallazgos coinciden con estudios realizados previamente en los que las vías de transducción de la ATII, que ocurren tras la activación de la PI3K, indujeron respuestas al Ca^{2+} y a la contracción en el MLV (Le Blanc, *et al.*, 2004; Rakotoarisoa *et al.*, 2006). En miocitos vasculares, la isoforma γ de la PI3K (PI3K γ) ha sido la que inicialmente ha mostrado capacidad de modular la activación de las corrientes de Ca^{2+} tipo-L inducidas por ATII, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y provocando la contracción (Quignard *et al.*, 2001; Le Blanc, *et al.*, 2004; Rakotoarisoa *et al.*, 2006).

Este hecho se confirma en este trabajo en arterias de resistencia mesentéricas desprovistas de endotelio por el efecto del inhibidor de la PI3K LY-294002 sobre la entrada de Ca^{2+} tipo-L provocada por despolarización con una solución rica en K^+ . La PI3K γ /Akt fosforila la subunidad $\text{Ca}_v\beta_2$ e induce la traslocación de $\text{Ca}_v\alpha_1\text{C}$ incrementando así las corrientes de Ca^{2+} tipo-L en miocitos arteriales. La inhibición farmacológica de la PI3K γ presenta efectos vasodilatadores y reduce la presión arterial (Carnevale *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la inhibición de la PI3K reduce significativamente la movilización de Ca^{2+} intracelular y la contracción fásica inducida por Phe en arterias de resistencia, lo que sugiere que la PI3K podría activar también la entrada independiente de voltaje tipo SOC a través de la estimulación de la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares.

Esta vía de señalización se encuentra acoplada al receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia, como lo demuestra el efecto inhibitorio sobre la entrada de Ca^{2+} y sobre la contracción inducido por la depleción del RS, causado a su vez por bloqueo de la SERCA con CPA, o por el tratamiento con el bloqueante de la entrada SOCE Pyr6 (Santiago *et al.*, 2015).

La estimulación del receptor α_1 -adrenérgico causa movilización del Ca^{2+} intracelular mediante la liberación de Ca^{2+} de los depósitos del RS vía receptor de IP_3 (Liu & Khalil, 2018). Por lo tanto, es probable que la reducción de la movilización del Ca^{2+} intracelular inducida por Phe tras la inhibición de la PI3K con LY-294002 se deba a la inhibición de esta vía dependiente de IP_3 , tal y como se ha descrito para el receptor IGF-1 acoplado a la cascada de señalización proteína G-PI3K-Fosfolipasa C en miocitos cardiacos (Ibarra *et al.*, 2004).

Discusión

Además, se sabe que la PI3K se encuentra involucrada en procesos de mitogénesis inducida por ET-1 que dependen de la entrada extracelular de Ca^{2+} a través de canales SOC y de canales de cationes no selectivos permeables al Ca^{2+} (Kawanabe *et al.* 2002), por lo que el papel regulador de la PI3K sobre la movilización del Ca^{2+} intracelular, la contracción o la sensibilización al Ca^{2+} en arterias de resistencia mesentéricas también fue evaluado. Tras inhibir la PI3K con LY-294002 no se observaron variaciones significativas en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni en la contracción asociada a dicho incremento. Por otro lado, en relación al efecto de la inhibición de la PI3K sobre la movilización del Ca^{2+} intracelular y en la contracción asociada a ella, se observó una importante reducción de la movilización del Ca^{2+} aunque la contracción no se vio afectada de forma significativa. Esto podría indicar que la PI3K se encuentra regulando la entrada y movilización del Ca^{2+} intracelular acopladas al receptor de ET y asociadas a procesos no contráctiles en arterias de resistencia.

Sin embargo, recientemente hemos demostrado que tras la activación de los canales VOC tipo-L, el RyR media un proceso de CICR como un potente mecanismo de amplificación de la entrada de Ca^{2+} y contracción en arterias de resistencia mesentéricas (Sánchez *et al.*, 2018). Ya que los receptores de rianodina RyR1 y RyR2 pueden ser fosforilados por cinasas tales como la PKA, lo que conlleva la liberación de Ca^{2+} de los depósitos del RS (Bovo *et al.*, 2017; Meissner, 2017), realizamos experimentos adicionales para estudiar si la PI3K podría regular el proceso de CICR mediado por RyR tras la activación de los canales VOC tipo-L.

Bajo condiciones de bloqueo del RyR con rianodina, la inhibición selectiva de la PI3K con LY294002 redujo significativamente los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pero no la contracción inducida mediante despolarización con K^+ . Aunque la fosforilación del RyR no se puede descartar, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la activación de la PI3K modula la entrada de Ca^{2+} a través de una regulación directa sobre el canal VOC tipo-L en arterias de resistencia, como ha sido debatido anteriormente en esta discusión y previamente descrito en miocitos vasculares aislados (Le Blanc *et al.*, 2004).

Una actividad incrementada de la PI3K, así como una regulación al alza de la isoforma δ (PI3K δ), se han encontrado asociadas a una entrada de Ca^{2+} tipo-L potenciada en miocitos arteriales procedentes de modelos de rata de diabetes tipo I (Pinho *et al.*, 2010) y modelos de obesidad genética/resistencia a la insulina (Sánchez *et al.*, 2018). Mientras que en el primer modelo la PI3K contribuye a un incremento en la vasoconstricción, en el segundo, la entrada de Ca^{2+} mediada por la PI3K compensa la disfunción de los almacenes de Ca^{2+} del RS. En el corazón, la vía PI3K α /Akt está involucrada en acciones ionotrópicas de la insulina y activa corrientes de Ca^{2+} en regiones de la membrana plasmática que contienen canales VOC tipo-L (Lu *et al.*, 2009). Esta vía de señalización y la correspondiente entrada de Ca^{2+} tipo-L es defectuosa en estados de deficiencia y resistencia a insulina, lo que podría contribuir a la disfunción en la contractilidad cardiaca presente en una cardiomiopatía diabética (Lu *et al.*, 2007; Ghigo *et al.*, 2017).

Por otra parte, la vía ERK1/2 MAPK se encuentra implicada en procesos mitogénicos de la insulina, pero también está asociada a la vasoconstricción aumentada mediada por insulina en estados de resistencia a ésta en ciertos lechos vasculares (Kim *et al.*, 2006; Contreras *et al.*, 2010; Prieto *et al.*, 2013). En este estudio, el inhibidor selectivo de la ERK-MAPK PD-98059 no produjo cambios significativos en la movilización de Ca^{2+} intracelular en respuesta a la Phe en arterias de resistencia. Sin embargo, este inhibidor causó una marcada inhibición de la entrada de Ca^{2+} sostenida estimulada por la Phe pero sin afectar a la contracción asociada a dicha entrada.

Estos resultados difieren de los resultados descritos en estudios previos que involucran a la ERK-MAPK en la vasoconstricción dependiente de Ca^{2+} acoplada al receptor de ATII en arterias de resistencia humanas (Touyz *et al.*, 1999), y en la contracción mediada por sensibilización al Ca^{2+} y acoplada al receptor de ET en miocitos de arterias coronarias (Cain *et al.*, 2002). Por otro lado, estos resultados difieren también de estudios que implican a las ramas de la p38 y JNK de la vía de señalización de la MAPK en la vasoconstricción sensible a nifedipina acoplada al receptor α_1 -adrenérgico en el MLV de arterias de gran calibre (Ok *et al.*, 2011). En contraste, nuestros datos sugieren un papel principal de la MAPK en la regulación de la entrada de Ca^{2+} tipo-L acoplada al receptor α_1 -adrenérgico en arterias mesentéricas, apoyados por la marcada inhibición producida por el bloqueante selectivo de la MAPK

PD-98059 sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por despolarización con K^+ en condiciones de bloqueo del RyR. Por otro lado, estos resultados estarían de acuerdo con los estudios que han descrito la fosforilación de los canales $\text{Ca}_v1.2$ por la ERK-MAPK, incrementando las corrientes de Ca^{2+} tipo-L en miocitos cardiacos como respuesta a factores de crecimiento involucrados en la hipertrofia cardiaca (Takahashi *et al.*, 2004).

Las diferencias observadas en el papel de la ERK-MAPK en el metabolismo del Ca^{2+} y la contracción en miocitos vasculares pueden deberse a las diferentes formas de activación de esta vía en función de diversos receptores. Nuestros resultados sugieren que la modulación del metabolismo del Ca^{2+} por la ERK-MAPK puede estar relacionada con vías de señalización acopladas al receptor α_1 -adrenérgico que no se encuentren asociadas a procesos contráctiles en el VSM, sino a procesos proliferativos y de migración celular, coincidiendo con el estudio realizado por Kudryavtseva *et al.* (2013). De todas formas, son necesarios más estudios para investigar el papel modulador de la vía de la MAPK acoplada a receptor en la entrada de Ca^{2+} involucrada en procesos de proliferación celular.

Por otro lado, también se ha investigado en el presente estudio el posible papel de la ERK-MAPK sobre la movilización del Ca^{2+} intracelular, la contracción o la sensibilización al Ca^{2+} acopladas al receptor de ET en arterias de resistencia mesentéricas. En relación a los efectos de la ERK-MAPK sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la tensión, no se apreciaron diferencias ni en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni en la tensión al inhibir la vía de señalización de la ERK-MAPK. Tampoco se observaron diferencias significativas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ni en la tensión provocadas por la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. Estos resultados son similares a los descritos en el estudio de Chen *et al.* (2009), en el que se observó que el flujo de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L no participa en la activación de la vía ERK1/2 inducida por ET-1 y la activación de dicha vía no implica tampoco cambios en los procesos de señalización de Ca^{2+} en células aisladas del MLV aórtico humano. Sin embargo, sí se ha descrito la activación de ERK1/2 como consecuencia de la entrada de Ca^{2+} a través de canales SOC activados en respuesta a la depleción de los almacenes del RS inducida por la ET-1 en cultivos de células RBL-1 (Chang *et al.* 2008). Además, Kawanabe *et al.* (2002) describieron que la activación de la vía ERK1/2 inducida por ET-1 requiere de una cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} , ya sea procedente de la entrada a través de canales de cationes no

selectivos permeables al Ca^{2+} o a través de canales SOC, aunque también puede activarse mediante una cascada de señalización independiente del flujo de Ca^{2+} en las CMLV de carótida de conejo (Kawanabe *et al.*, 2002).

Nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Chen *et al.* (2009) en VSMC humanas, ya que sugieren que la activación de la ERK1/2 inducida por ET-1 tiene lugar de forma independiente a la señalización intracelular de Ca^{2+} . Los receptores ET_A tienen un efecto predominante sobre los ET_B en el control de la activación de la vía ERK-MAPK inducida por ET-1 en las CMLV humanas, encontrándose dicha activación relacionada con la actividad de la PKC, PKA y PI3K, pero siendo independiente de la señalización intracelular de Ca^{2+} (Chen *et al.*, 2009; Quin-wen *et al.*, 2009).

En miocitos cardiacos, la fosforilación de los canales $\text{Ca}_v1.2$ por la ERK-MAPK así como el aumento de las corrientes de Ca^{2+} tipo-L se potencian mediante la acción de la PKC acoplada a la activación de GPCR (Smani *et al.*, 2010). Actualmente, existe una amplia información sobre el papel de la PKC en la vasoconstricción y el metabolismo del Ca^{2+} arterial. Esta cinasa se ha asociado principalmente a los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia (Buus *et al.*, 1998; Villalba *et al.*, 2007; Kitazawa & Kitazawa, 2012). La PKC fosforila la fosfoproteína CPI-17, un potente inhibidor de la MLCP, inactivándola y así provocando un aumento del tono vascular (Somlyo & Somlyo, 2003). Sin embargo, en nuestro estudio, el inhibidor de la PKC GF-109203X no provocó cambios en el incremento inicial de $[\text{Ca}^{2+}]$ debido a la movilización de Ca^{2+} intracelular, pero redujo sustancialmente el incremento sostenido en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la estimulación con Phe. Además produjo, aunque en menor medida, una inhibición de la vasoconstricción de las arterias de resistencia mesentéricas. Esto sugiere un importante papel de la PKC en la regulación de la entrada de Ca^{2+} mayor que la potenciación de la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos en miocitos arteriales. Esto último también se demuestra al no producirse ningún cambio en la relación Ca^{2+} -tensión para el agonista α_1 -adrenérgico en presencia del inhibidor de la PKC.

Discusión

La participación de la PKC en la entrada de Ca^{2+} en arterias de resistencia está de acuerdo parcialmente con los resultados descritos por Kitazawa & Kitazawa (2012). Sin embargo, estos autores mostraron que el inhibidor GF-109203X produce una ligera reducción de la entrada de Ca^{2+} inducida por Phe, mientras que abolió la vasoconstricción y redujo la fosforilación de la MLC, CPI-17 y la MYPT1, resultados que apoyan la implicación de la PKC en el proceso de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil del MLV mesentérico tras la activación del receptor α_1 -adrenérgico.

Las diferencias entre nuestros resultados, los cuales muestran un leve efecto inhibitorio del GF-109203X sobre la sensibilización al Ca^{2+} acoplada a la vasoconstricción inducida por Phe, y los obtenidos por Kitazawa & Kitazawa (2012), pueden deberse al hecho de que diferentes isoformas de la familia de la PKC modulen procesos de sensibilización al Ca^{2+} y vías de entrada de Ca^{2+} en músculo liso arterial (Liu & Khalil, 2018). Así, las isoformas convencionales de la PKC Ca^{2+} -dependientes (α , $-\beta_1$, $-\beta_2$ and $-\gamma$) son activadas por el Ca^{2+} citosólico y el DAG, lo que da lugar a la fosforilación de una gran variedad de sustratos que están implicados en la regulación de los flujos de Ca^{2+} . Concretamente, la PKC α se encuentra involucrada en la regulación de la entrada de Ca^{2+} tipo-L tanto en miocitos vasculares como cardíacos (Yang *et al.*, 2009; Gulia *et al.*, 2013). A diferencia de las denominadas isoformas convencionales de la PKC α y β , las isoformas noveles δ y ϵ parecen mediar la vasoconstricción acoplada a vías de sensibilización de Ca^{2+} (Liu & Khalil, 2018). El inhibidor GF-109203X es selectivo para las isoformas convencionales PKC α y β_1 pero puede tener un efecto sobre las isoformas δ y ϵ de la PKC a un rango de concentración micromolar mayor, como el utilizado en el estudio de Kitazawa & Kitazawa (2012) (Liu & Khalil, 2018).

En el presente estudio, la participación de la PKC en la entrada de Ca^{2+} inducida por Phe y sensible a bloqueo de los canales VOC tipo-L se evidencia mediante el fuerte efecto inhibitorio del GF-109203X sobre la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L provocada por despolarización con K^+ . Esto sugiere que la PKC modula la entrada de Ca^{2+} tipo-L acoplada al receptor α_1 -adrenérgico en arterias de resistencia, apoyando por tanto el hecho de que la modulación de la PKC sobre los canales VOC tipo-L en miocitos arteriales (Gulia *et al.*, 2013) no sólo contribuye a mantener el tono miogénico, sino que interviene en la vasoconstricción inducida por agonistas (Cobine *et*

al., 2007; Potts *et al.*, 2012). La actividad de las isoformas noveles y convencionales de la PKC se encuentra potenciada de forma crónica en la hiperglucemia, lipotoxicidad y estrés oxidativo. Esta actividad incrementada de la PKC se ha asociado con las complicaciones cardiovasculares derivadas de estados de resistencia a insulina (Geraldés & King, 2010; Turban & Hajdúch, 2011). La actividad anormal de la PKC contribuye a una mayor entrada de Ca^{2+} tipo-L y a una vasoconstricción incrementada en arterias de modelos de ratas Wistar con diabetes inducida (Ungvari *et al.*, 1999) y en arterias de modelos de ratas genéticamente obesas (Sánchez *et al.*, 2018), compensando en estas últimas la disfunción que presentan en los depósitos de Ca^{2+} del RS.

Además, en el presente estudio también se evaluó el papel de la PKC en la vasoconstricción y en los mecanismos intracelulares del Ca^{2+} acoplados al receptor de ET. La inhibición de la PKC provocó una reducción de la entrada de Ca^{2+} así como una marcada disminución de la vasoconstricción inducida por ET-1, lo que sugiere que la activación del receptor de ET en el MLV de arterias de resistencia activa tanto la entrada de Ca^{2+} como procesos de sensibilización al Ca^{2+} . Esto se explicaría en parte por lo discutido anteriormente, ya que la PKC puede fosforilar los canales VOC tipo-L afectando al flujo de entrada de Ca^{2+} a través de ellos (Pollock *et al.*, 1995 Cobine *et al.*, 2007; Potts *et al.*, 2012). Por otro lado, el DAG producido tras la activación del receptor de ET provoca la activación de la PKC (Chen *et al.*, 2009), la cual va a actuar favoreciendo la vasoconstricción al incrementar la fosforilación de la MLC vía inhibición de la MLCP y también al originar la fosforilación de las proteínas de unión a actina calponina y caldesmon a través de una cascada de señalización (Liu & Khalil 2018).

La PKC ha sido ampliamente asociada a los procesos de sensibilización al Ca^{2+} . Sin embargo, el complejo papel de la PKC en estos mecanismos es difícil de establecer debido a la naturaleza multifuncional de esta proteína y todas sus isoformas. Se sabe que la PKC interviene en la sensibilización al Ca^{2+} a través de la fosforilación de la CPI-17, proteína que inhibe la MLCP promoviendo la sensibilización al Ca^{2+} (Dimopoulos *et al.* 2007; Eto *et al.* 2004).

Discusión

Se ha demostrado que la PKC contribuye a los procesos de sensibilización al Ca^{2+} en arterias de la cola en modelos de ratas diabéticas incrementando la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{2+} , aunque esto parece ser dependiente de cada tejido (Kizub *et al.*, 2010). En nuestro estudio se puede observar que al inhibir la PKC se necesitó una cantidad de Ca^{2+} proporcionalmente mayor para alcanzar una determinada tensión que la necesaria en ausencia del inhibidor de la PKC. Esto es indicativo de que al inhibir esta enzima se produce una disminución de los procesos de sensibilización al Ca^{2+} dependientes de las vías de señalización acopladas al receptor de ET en arterias de resistencia. La falta de efecto de los inhibidores de la PI3K y de la MAPK sobre las relaciones $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -tensión para la ET-1 observadas en el presente estudio, así como de los inhibidores de la RhoK sobre la vasoconstricción sostenida inducida por ET-1 en arterias mesentéricas (Compeer *et al.*, 2013), demuestran por primera vez que la PKC es la principal responsable de los procesos de sensibilización al Ca^{2+} en la vasoconstricción sostenida de la ET-1 en arterias de resistencia mesentéricas.

También es de destacar que la inhibición de la PKC suscitó un incremento de la movilización de Ca^{2+} intracelular pero sin afectar a la contracción fásica asociada a dicha movilización. Esto podría estar asociado en parte al efecto inhibitorio sobre la generación de IP_3 por parte de la PKC. Al estimularse el receptor de ET se va a generar DAG e IP_3 . El DAG va a activar a la PKC, la cual inhibe la producción de más IP_3 por parte de la PLC (Rebecchi & Pentylala, 2000). De este modo, al inhibir la PKC se pierde ese efecto inhibitorio sobre la generación de IP_3 , el cual va a provocar una mayor movilización de Ca^{2+} intracelular. Esto puede significar que la activación de la PKC podría ejercer una regulación a la baja de la movilización de Ca^{2+} intracelular asociada a procesos no contráctiles así como de la entrada de Ca^{2+} no asociada a procesos contráctiles.



VIII. CONCLUSIONES

Conclusiones

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha valorado el papel de las cinasas PI3K, MAPK, y PKC en los mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico y al receptor de ET en arterias de resistencia.

De los resultados obtenidos se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. La vasoconstricción α_1 -adrenérgica está mediada por la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, por la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L y canales SOC, y por mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en arterias de resistencia.
2. La PI3K estimula la movilización de Ca^{2+} intracelular, la entrada de Ca^{2+} y la vasoconstricción sin afectar a los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico.
3. La MAPK regula la entrada de Ca^{2+} no asociada a la vasoconstricción α_1 -adrenérgica, por lo que no se encuentra asociada a los procesos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil.
4. La PKC, posiblemente una isoforma convencional dependiente de Ca^{2+} , participa en la regulación de la entrada de Ca^{2+} pero no en los procesos de sensibilización al Ca^{2+} acoplados al receptor α_1 -adrenérgico.
5. La vasoconstricción acoplada al receptor de ET en el MLV depende de la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, de la entrada de Ca^{2+} a través de canales VOC tipo-L y canales SOC, y de mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} en arterias de resistencia.
6. La PI3K estimula la movilización de Ca^{2+} intracelular no asociada a contracción mientras que la MAPK no parece estar implicada en los mecanismos de señalización de Ca^{2+} acoplados al receptor de ET.

Conclusiones

7. La PKC participa en la entrada de Ca^{2+} extracelular, inhibe la movilización de los depósitos intracelulares y está implicada en la sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil acoplada al receptor de ET en el MLV.
8. Las cinasas PI3K, MAPK y PKC regulan de forma selectiva la entrada de Ca^{2+} tipo-L en el MLV de arterias de resistencia.

CONCLUSIÓN FINAL

La evidencia experimental de los últimos años señala un papel clave de los procesos de regulación de Ca^{2+} mediados por proteínas cinasas en miocitos arteriales y cardíacos. Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que la PI3K, la MAPK y la PKC se encuentran diferencialmente implicadas en la modulación de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales VOC tipo-L, en la movilización de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y en los procesos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil en el MLV en arterias de resistencia. Este papel regulador está mayoritariamente asociado a procesos no contráctiles acoplados al receptor α_1 -adrenérgico y a mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil en el caso del receptor de ET. En estados patológicos como la hipertensión o la resistencia a insulina que cursan con complicaciones vasculares, las alteraciones de las vías de señalización de la PI3K, MAPK y PKC podrían estar implicadas en el cambio del fenotipo contráctil a proliferativo del MLV y participar en procesos de remodelado vascular, así como en la vasoconstricción exacerbada como consecuencia del incremento de los procesos de sensibilización al Ca^{2+} .

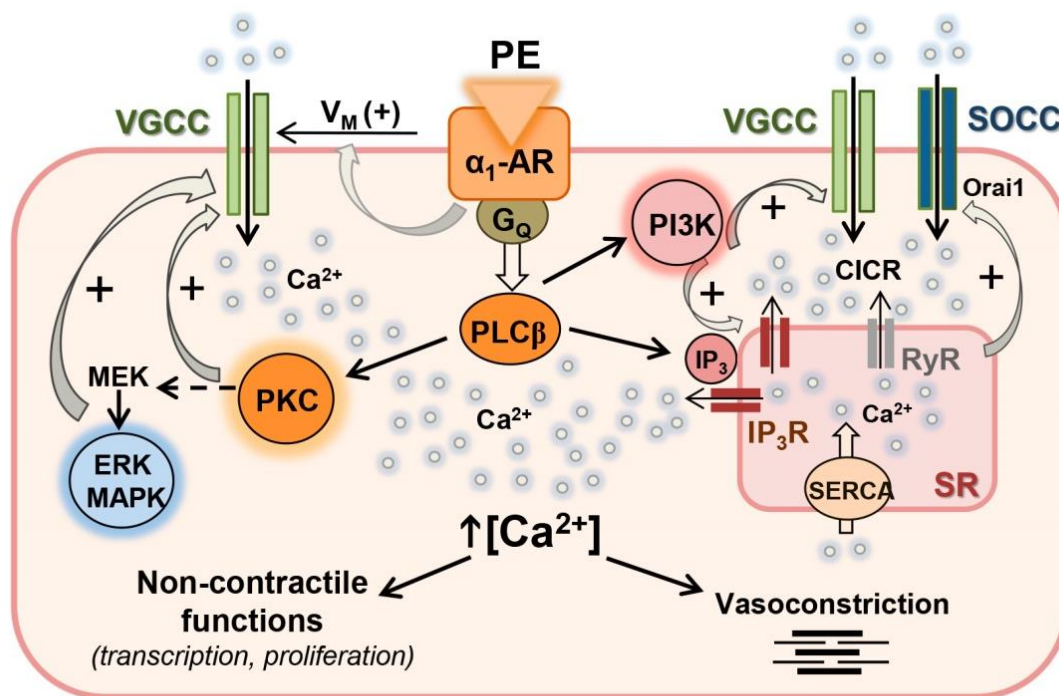


Figura VII. Mecanismo propuesto para la regulación de las vías de señalización de Ca²⁺ por la PI3K, MAPK y PKC en el MLV de arterias de resistencia acopladas al receptor α_1 -adrenérgico. La activación del receptor α_1 -adrenérgico por la Phe se encuentra acoplado a la despolarización de la membrana plasmática, lo que activa los canales VOC tipo-L y produce la entrada de Ca²⁺ extracelular y la vasoconstricción. El receptor α_1 -adrenérgico también se encuentra acoplado a la activación de la PLC β , la cual estimula la movilización del Ca²⁺ de los depósitos intracelulares del RS mediante la activación de los IP₃R. Además, la PLC β estimula la PKC, que va a activar la cascada de señalización intracelular de la ERK/MAPK. Tanto la PKC como la ERK/MAPK pueden actuar directamente sobre el canal VOC tipo-L e incrementar el influjo de Ca²⁺ asociado mayormente a procesos no contráctiles. Asimismo, el receptor α_1 -adrenérgico se asocia a la activación de la PI3K y a la estimulación de la movilización de Ca²⁺ vía IP₃R y de la entrada de Ca²⁺ a través del canal VOC tipo-L. El influjo de Ca²⁺ a través de los canales VOC tipo-L amplifica la señal de Ca²⁺ a través del proceso CICR mediado por el RyR, mientras que el vaciamiento de los almacenes de Ca²⁺ del RS provoca la activación de canales SOC de la membrana plasmática con el objetivo de rellenar los depósitos intracelulares de Ca²⁺.

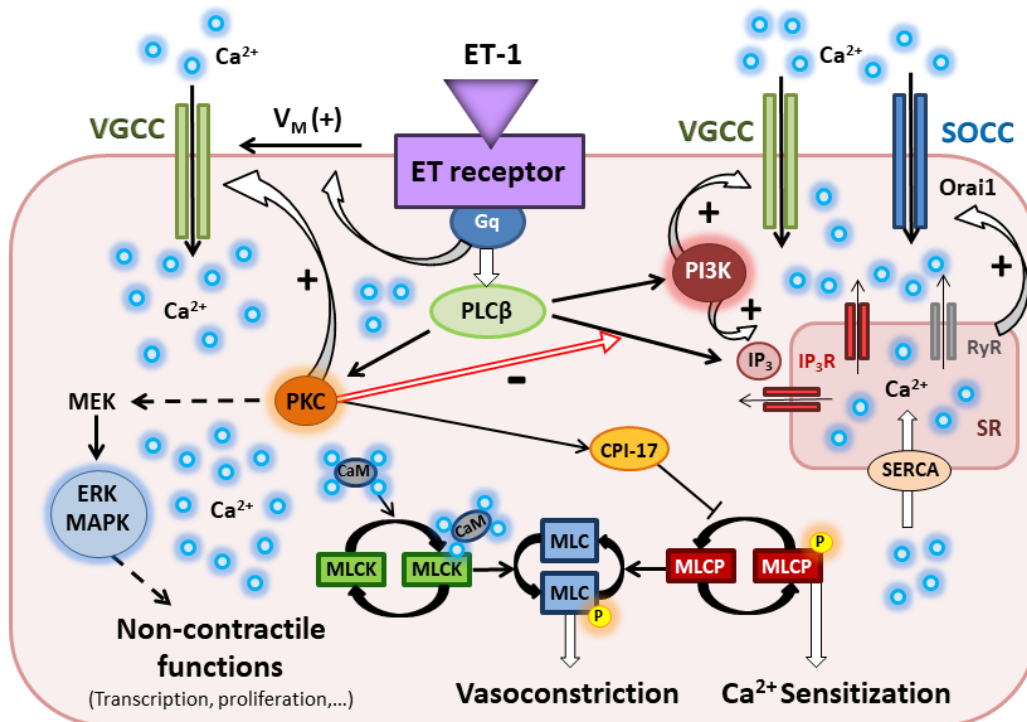


Figura VII. Mecanismo propuesto para la regulación de las vías de señalización de Ca^{2+} por la PI3K, MAPK y PKC en el MLV de arterias de resistencia acopladas al receptor de ET. La activación del receptor de ET por la ET-1 se encuentra acoplado a la despolarización de la membrana plasmática, lo que activa los canales VOC tipo-L y produce la entrada de Ca^{2+} extracelular y la vasoconstricción. El receptor de ET también se encuentra acoplado a la activación de la PLC β , la cual estimula la movilización del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del RS mediante la activación de los IP $_3$ R. Además, la PLC β estimula la PKC, que activa procesos de sensibilización al Ca^{2+} , posiblemente actuando sobre la MLCP. La PKC tiene un potente efecto sobre los mecanismos de sensibilización al Ca^{2+} a través de la fosforilación de CPI-17 y la inhibición de la MLCP. El receptor de ET también se asocia a la activación de la PI3K y a la estimulación de la movilización de Ca^{2+} vía IP $_3$ R y de la entrada de Ca^{2+} a través del canal VOC tipo-L. Tanto la PKC como la PI3K pueden actuar directamente sobre el canal VOC tipo-L e incrementar el influjo de Ca^{2+} asociado a procesos contráctiles. Además, la PKC reduce la liberación de Ca^{2+} del RS. Por otro lado, El influjo de Ca^{2+} a través de los canales VOC tipo-L amplifica la señal de Ca^{2+} a través del proceso CICR mediado por el RyR, mientras que el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} del RS provoca la activación de canales SOC de la membrana plasmática con el objetivo de rellenar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .



IX. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Adam, L., & Hathaway, D. (1993). Identification of mitogenactivated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-caldesmon. *FEBS Lett*, 322: 56–60.
- Albert, A., & Large, W. (2002). A Ca²⁺-permeable non-selective cation channel activated by depletion of internal Ca²⁺ stores in single rabbit portal vein myocytes. *J physiol*, 538:717-728.
- Amberg, G., & Navedo, M. (2013). Calcium dynamics in vascular smooth muscle. *Microcirculation*, 20(4):281–289.
- Amberg, G., Rossow, C., Navedo, M., & Santana, L. (2004). NFATc3 regulates Kv2.1 expression in arterial smooth muscle. *J Biol Chem*, 279: 47326-47334.
- Behuliak, M., Pintérová, M., Bencze, M., Petrová, M., Líšková, S., Karen, P., y otros. (2013). Ca²⁺ sensitization and Ca²⁺ entry in the control of blood pressure and adrenergic vasoconstriction in conscious Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 31: 2025-2035.
- Behuliak, M., Vavřínová, A., Bencze, M., Polgárová, K., Ergang, P., J., K., y otros. (2015). Ontogenetic changes in contribution of calcium sensitization and calcium entry to blood pressure maintenance of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 33: 2443-2454.
- Berra-Romani, R., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M., & Golovina, V. (2008). Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295: C779-C790.
- Berridge, M. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361: 315-325.
- Berridge, M. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol*, 499: 291-306.
- Berridge, M., Bootman, M., & Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature*, 395 (6703): 645-8.
- Betts, L., & Kozłowski, R. (2000). Electrophysiological effects of endothelin-1 and their relationship to contraction in rat renal arterial smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 130:787–796.

Bibliografía

- Bezaniilla, F. (2008). How membrane proteins sense voltage. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4):323–332.
- Bezy, O., Tran, T., Pihlajamaki, J., Suzuki, R., Emanuelli, B., Winnay, J., y otros. (2011). PKCdelta regulates hepatic insulin sensitivity and hepatosteatosis in mice and humans. *J Clin Invest*, 121: 2504–2517.
- Bkaily, G., Naik, R., D'Orléans-Juste, P., Wang, S., & Fong, C. (1995). Endothelin-1 activates the R-type Ca²⁺ channel in vascular smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26(Suppl 3):S303–306. .
- Bolton, T. (2006). Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. *J Physiol*, 570:5–11.
- Bolz, S., Vogel, L., Sollinger, D., Derwand, R., De Wit, C., Loirand, G., y otros. (2003). Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation*, 107:3081–3087.
- Bootman, M., & Berridge, M. (1996). Subcellular Ca²⁺ signals underlying waves and graded responses in HeLa cells. *Curr Biol*, 6: 855-865.
- Bootman, M., Collins, T., Peppiatt, C., Prothero, L., MacKenzie, L., De Smet, P., y otros. (2001). Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol*, 12: 3–10.
- Boulanger, C., Desta, B., Clozel, J., & Vanhoutte, P. (1994). Chronic treatment with the CA²⁺ channel inhibitor RO 40-5967 potentiates endothelium-dependent relaxations in the aorta of the hypertensive salt sensitive Dahl rat. *Blood Press*, 3(3):193-6.
- Bovo, E., Huke, S., Blatter, L., & Zima, A. (2017). The effect of PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor on SR Ca²⁺ leak in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 104: 9–16.
- Budzyn, K., Paull, M., Marley, P., & Sobey, C. (2006). Segmental differences in the roles of rho-kinase and protein kinase C in mediating vasoconstriction. *J Pharmacol Exp Ther*, 317: 791–796.

Bibliografía

- Bueno, O., & Molkenin, J. (2002). Involvement of Extracellular Signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ. Res*, 91: 776–781.
- Buus, C., Aalkjaer, C., Nilsson, H., Juul, B., Moller, J., & Mulvany, M. (1998). Mechanisms of Ca²⁺ sensitization of force production by noradrenaline in rat mesenteric small arteries. *J Physiol*, 510: 577–590.
- Cain, A., Tanner, D., & Khalil, R. (2002). Endothelin-1–induced enhancement of coronary smooth muscle contraction via MAPK-dependent and MAPK-independent [Ca(2+)](i) sensitization pathways. *Hypertension*, 39: 543–549.
- Calderón-Rivera, A., Andrade, A., Hernández-Hernández, O., González-Ramírez, R., Sandoval, A., Rivera, M., y otros. (2012). Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca(2+) channel $\alpha(2)\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*, 51(1):22-30.
- Cannan, C., Burnett Jr, J., & Lerman, A. (1996). Enhanced coronary vasoconstriction to endothelin-B-receptor activation in experimental congestive heart failure. *Circulation*, 93: 646–651.
- Carbone, E., & Lux, H. (1984). A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurons. *Nature*, 310: 501-502.
- Carnevale, D., & Lembo, G. (2012). PI3K γ in hypertension: a novel therapeutic target controlling vascula rmyogenic tone and target organ damage. *Cardiovasc Res*, 95: 403–408.
- Cartin, L., Lounsbury, K., & Nelson, M. (2000). Coupling of Ca²⁺ to CREB activation and gene expression in intact cerebral arteries from mouse - Roles of ryanodine receptors and voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Circ Res*, 86: 760-767.
- Cassidy, J., Ferron, L., Kadurin, I., Pratt, W., & Dolphin, A. (2014). Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary $\alpha 2\delta$ -1 subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111(24):8979-84.
- Catterall, W. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16: 521-555.

Bibliografía

- Catterall, W. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8):a003947.
- Chabrier, P., Auguet, M., Roubert, P., Lonchamp, M., Gillard, V., Guillon, J. D., y otros. (1989). Vascular mechanism of action of endothelin-I: Effect of Ca²⁺ antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 13 (Suppl. 5), s32-s35.
- Chang, W., Di Capite, J., Singaravelu, K., Nelson, C., Halse, V., & Parekh, A. (2008). Local Ca²⁺ influx through Ca²⁺ release-activated (CRAC) channels stimulates production of an intracellular messenger and an intercellular pro-inflammatory signal. *J Biol Chem*, 283 (8): 4622-4631. .
- Chen, Q., Edvinsson, L., & Xu, C. (2009). Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*, 10:52.
- Chuang, T., Au, L., Wang, L., Ho, L., Yang, D., & Juan, C. (2012). Potential effect of resistin on the ET-1-increased reactions of blood pressure in rats and Ca²⁺ signaling in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 227(4):1610-8.
- Clerk, A., TJ., K., Harrison, J., Mullen, A., Barton, P., & Sugden, P. (2002). Up-regulation of c-jun mRNA in cardiac myocytes requires the extracellular signal-regulated kinase cascade, but c-Jun N-terminal kinases are required for efficient up-regulation of c-Jun protein. *Biochem J* , 368: 101–110.
- Cobine, C., Callaghan, B., & Keef, K. (2007). Role of L-type calcium channels and PKC in active tone development in rabbit coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: H3079–H3088.
- Collier, M., Ji, G., Wang, Y., & Kotlikoff, M. (2000). Calcium-induced calcium release in smooth muscle: Loose coupling between the action potential and calcium release. *Journal of General Physiology*, 115(5):653–662.
- Compeer, M., Janssen, G., & De Mey, J. (2013). Endothelin-1 and endothelin-2 initiate and maintain contractile responses by different mechanisms in rat mesenteric and cerebral arteries. *Br J Pharmacol*, 170(6):1199-209.

Bibliografía

- Contreras, C., Sánchez, A., Martínez, P., Climent, B., Benedito, S., García-Sacristán, A., y otros. (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.
- Contreras, C., Sánchez, A., Martínez, P., Raposo, R., Climent, B., García-Sacristán, A., y otros. (2010). Insulin resistance in penile arteries from a rat model of metabolic syndrome. *Br J Pharmacol*, 161: 350–364.
- Coussin, F., Macrez, N., Morel, J., & Mironneau, J. (2000). Requirement of ryanodine receptorsubtypes 1 and 2 forCa(2+)-induced Ca(2+) release in vascularmyocytes. *J Biol Chem*, 275(13):9596–9603. .
- Crackower, M., Oudit, G., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., y otros. (2002). Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*, 110:737–749.
- Cramer, H., Schmenger, K., Heinrich, K., Horstmeyer, A., Böning, H., Breit, A., y otros. (2001). Coupling of endothelin receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *Eur J Biochem*, 268:5449–5459.
- Crestani, S., Webb, R., & da Silva-Santos, J. (2017). High-salt intake augments the activity of the RhoA/rock pathway and reduces intracellular calcium in arteries from rats. *Am J Hypertens*, 30: 389–399.
- Crews, J., Murphy, J., & KhalilGender, R. (1999). Differences in Ca(2+) entry mechanisms of vasoconstriction in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 34: 931-936.
- Crozatier, B. (2006). Central role of PKCs in vascular smooth muscle cell ion channel regulation. *J Mol Cell Cardiol*, 41: 952–955.
- D'Angelo, G., & Adam, L. (2002). Inhibition of ERK attenuates force development by lowering myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282:H602–H610.
- D'Angelo, G., Davis, M., & Meininger, G. (1997). Calcium and mechanotransduction of the myogenic response. *Am J Physiol*, 273:175–182.

Bibliografía

- Dagassan, P., Breu, V., Clozel, M., Kunzli, A., Vogt, P., Turina, M., y otros. (1996). Up-regulation of endothelin-B receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 27, 147–153.
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C., y otros. (2010). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107(4):1654-9.
- Davis, M. (2012). Physiological role(s) of the vascular myogenic response. *Microcirculation*, 19:99–114.
- Davis, M., & Hill, M. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*, 79:387–423.
- Davis, M., Hill, M., & Kuo, L. (2011). Local regulation of microvascular perfusion. *Compr Physiol. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons*, 161–284.
- Del Valle-Rodriguez, A., Lopez-Barneo, J., & Urena, J. (2003). Ca²⁺ channel-sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx. *EMBO J*, 22:4337–4345.
- Dempsey, E., Newton, A., Mochly-Rosen, D., Fields, A., Reyland, M., Insel, P., y otros. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279: L429–438.
- Dessy, C., Kim, I., Sougnéz, C., Laporte, R., & Morgan, K. (1998). A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoceptor stimulation. *Am J Physiol*, 275: C1081–C1086.
- Dimopoulos, G., Semba, S., Kitazawa, K., Eto, M., & Kitazawa, T. (2007). Ca²⁺-dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circ Res*, 100(1): 121-9.
- Docherty, J. (1998). Subtypes of functional α 1-and α 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, 361: 1–15.

Bibliografía

- Dong, F., Zhang, X., Wold, L., Ren, Q., Zhang, Z., & Ren, J. (2005). Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol*, 145(3):323-33.
- Dorn, G., & Force, T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*, 115: 527–537.
- Dorn, G., Tepe, N., Lorenz, J., Koch, W., & Liggett, S. (1999). Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:6400–6405.
- Eguchi, S., Matsumoto, T., Motley, E., Utsunomiya, H., & Inagami, T. (1996). Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 271:14169–14175.
- Eto, M., Kitazawa, T., & Brautigan, D. (2004). Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 8888–8893.
- Fagan, K., McMurtry, I., & Rodman, D. (2001). Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res*, 2: 90–101.
- Fan, H., Fernandez-Hernando, C., & Lai, J. (2014). Protein kinase C isoforms in atherosclerosis: pro- or anti-inflammatory? *Biochem Pharmacol*, 88: 139–149. .
- Faries, P., Rohan, D., & Logerfo, F. (2001). Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *J Vasc Surg*, 33: 601–607.
- Feng, J., Ito, M., Ichikawa, K., Isaka, N., Nishikawa, M., Hartshorne, D., y otros. (1999). Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem*, 274: 37385–37290.
- Fitzgerald, E. (2000). Regulation of voltage-dependent calcium channels in rat sensory neurones involves a Ras–mitogen-activated protein kinase pathway. *J Physiol*, 527 (Pt 3): 433–444.

Bibliografía

- Fitzgerald, E., & Dolphin, A. (1997). Regulation of rat neuronal voltage-dependent calcium channels by endogenous p21-ras. *Eur J Neurosci*, 9(6):1252-61.
- Fleischer, S., & Inui, M. (1989). Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Ann Rev Biophys Chemistry*, 18: 333-364.
- Ford, E. (2005). Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*, 28:1769–1778.
- Ford, E., Zhao, G., & Li, C. (2010). Pre-diabetes and the risk for cardiovascular disease: a systematic review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 55, 55: 1310–1317.
- Friel, D., & Tsien, R. (1992). A caffeine- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ store in bullfrog sympathetic neurones modulates effects of Ca²⁺ entry on [Ca²⁺]_i. *J Physiol*, 450: 217-246.
- Frielle, T., Collins, S., Daniel, K., Caron, M., Lefkowitz, R., & Kobilka, B. (1987). Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 7920–4.
- Fukata, Y., Amano, M., & Kaibuchi, K. (2001). Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 32–39.
- Gardner, J., Tokudome, G., Tomonari, H., Maher, E., Hollander, D., & Aviv, A. (1992). Endothelin-induced calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 262: C148–155.
- Geraldes, P., & King, G. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res*, 106: 1319-1331.
- Ghigo, A., Laffargue, M., Li, M., & Hirsch, E. (2017). PI3K and Calcium Signaling in Cardiovascular Disease. *Circ Res*, 121(3):282-292.
- Ghisdal, P., Vandenberg, G., & Morel, N. (2003). Rho-dependent kinase is involved in agonist-activated calcium entry in rat arteries. *J Physiol*, 551: 855–867.

Bibliografía

- Ghosh, D., Syed, A., Prada, M., Nystoriak, M., Santana, L., Nieves-Cintrón, M., y otros. (2017). Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Adv Pharmacol*, 78: 49–87.
- Glennon, P., Kaddoura, S., Sale, E., Sale, G., Fuller, S., & Sugden, P. (1996). Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ. Res.*, 78: 954–961.
- Gohla, A., Schultz, G., & Offermanns, S. (2000). Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction*, 87:221–227.
- Gollasch, M., Haase, H., Ried, C., Lindschau, C., Morano, I., Luft, F., y otros. (1998). L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *FASEB J*, 12: 593-601.
- Gonzales, A., Yang, Y., Sullivan, M., Sanders, L., Dabertrand, F., Hill-Eubanks, D., y otros. (2014). A PLCgamma1-dependent, force-sensitive signaling network in the myogenic constriction of cerebral arteries. *Sci Signal*, 7:ra49.
- Gonzalez De La Fuente, P., Savineau, J., & Marthan, R. (1995). Control of pulmonary vascular smooth muscle tone by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump blockers: thapsigargin and cyclopiazonic acid. *Pflugers Arch*, 429: 617–624.
- Guerini, D. (1998). The Ca²⁺ pumps and the Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Biometals*, 11: 319–330.
- Gulia, J., Navedo, M., Gui, P., Chao, J., Mercado, J., Santana, L., y otros. (2013). Regulation of L-type calcium channel sparklet activity by c-Src and PKC- α . *Am J Physiol Cell Physiol*, 305: C568–C577.
- Györke, S., & Fill, M. (1993). Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in heart. *Science*, 260 (5109): 807-9.
- Györke, S., & Fill, M. (1993). Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in heart. *Science*, 260: 807–809.

Bibliografía

- Hahnel, C., Gottmann, K., Wittinghofer, A., & Lux, H. (1992). p21ras Oncogene Protein Selectively Increases Low-voltage-activated Ca²⁺ Current Density in Embryonic Chick Dorsal Root Ganglion Neurons. *Eur J Neurosci* 1992, 4(4): 361-368.
- Han, Y., Hu, W., Chernaya, O., Antic, N., Gu, L., Gupta, M., y otros. (2006). Increased myosin light chain kinase expression in hypertension: Regulation by serum response factor via an insertion mutation in the promoter. *Mol Biol Cell*, 17: 4039-4050.
- Harraz, O., & Welsh, D. (2013a). Protein kinase A regulation of T-type Ca²⁺ channels in rat cerebral arterial smooth muscle. *J Cell Sci*, 126(Pt. 13): 2944–2954.
- Harraz, O., Brett, S., & Welsh, D. (2014). Nitric oxide suppresses vascular voltage-gated T-type Ca²⁺ channels through cGMP/PKG signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(2): H279-85.
- Hawrylyshyn, K., Michelotti, G., Coge, F., Guenin, S., & Schwinn, D. (2004). Update on human α 1-adrenoceptor subtype signaling and genomic organization. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 449–55.
- Hazzalin, C., & Mahadevan, L. (2002). MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (1): 30-40.
- Hei, Y., MacNeill, J., Sanghera, J., Diamond, L., Bryer-Ash, M., & Pelech, S. (1993). Characterization of insulin-stimulated seryl/threonyl protein kinases in rat skeletal muscle. *J Biol Chem*, 268: 13203–13213.
- Hiley, C., & Poon, H. (1994). Effects of endothelin peptides in isolated small mesenteric arteries of the rat-lack of vasodilator effect. *Can J Physiol Pharmacol*, 72(Suppl. 1), 108.
- 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.
- Huang, C., Chang, J., Xu, Y., Li, Q., Zou, Y., & Yan, S. (2010). Reduction of PKC β II activity in smooth muscle cells attenuates acute arterial injury. *Atherosclerosis*, 212: 123–130.

Bibliografía

- Huang, W., Bansode, R., NC., B., Mehta, M., & KD., M. (2012). Protein kinase C β deficiency attenuates obesity syndrome of ob/ob mice by promoting white adipose tissue remodeling. *J Lipid Res*, 53 (2012) 368–378.
- Hukovic, N., & Hadziselimovic, R. (1998). Endothelin 1 action on isolated rat stomach and the role of calcium ions in ET 1 induced depolarization of smooth muscle cells BC3H1. *Biochem Mol Biol Int*, 46: 877–886.
- Ibarra, C., Estrada, M., Carrasco, L., Chiong, M., Liberona, J., Cardenas, C., y otros. (2004). Insulin-like growth factor-1 induces an inositol 1,4,5-trisphosphate dependent increase in nuclear and cytosolic calcium in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 27: 7554-7565.
- Ihara, E., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J., Nawata, H., & Kanaide, H. (2002). Mechanism of down-regulation of L-type Ca $^{2+}$ channel in the proliferating smooth muscle cells of rat aorta. *J Cell Biochem*, 87: 242-251.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyau-Chi, T., Goto, K., y otros. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Inoue, Y., Oike, M., Nakao, K., Kitamura, K., & Kuriyama, H. (1990). Endothelin augments unitary calcium channel currents on the smooth muscle cell membrane of guinea-pig portal vein. *J Physiol Lond*, 423: 171–191.
- Inui, T., Ninomiya, H., Sasaki, Y., Makatani, M., Urade, Y., Masaki, T., y otros. (1999). Selective activation of excitation-contraction coupling pathways by ETA and ETB receptors in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 126: 893-90.
- Ishikawa, T., Hume, J., & Keef, K. (1993). Regulation of Ca $^{2+}$ channels by cAMP and cGMP in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 73: 1128-1137.
- Ito, H., Shimokawa, R., Nakaike, T., Fukai, M., Sakata, T., Takayanagi, T., y otros. (1994). Role of protein kinase C-mediated pathway in the pathogenesis of coronary artery spasm in a swine model. *Circulation*, 90: 2425-2431.
- Jackson, W. (2000). Ion channels and vascular tone. *Hypertension*, 35: 173–178.

Bibliografía

- Jaggar, J., Porter, V., Lederer, W., & Nelson, M. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(2): C235–C256.
- Jensen, P., Mulvany, M., Aalkjaer, C. (1992) Endogenous and exogenous agonist-induced changes in the coupling between $[Ca^{2+}]_i$ and force in rat resistance arteries. *Pflugers Arch.* 420(5-6):536-543.
- Jialal, I., Machha, A., & Devaraj, S. (2013). Small interfering-RNA to protein kinase C-delta reduces the proinflammatory effects of human C-reactive protein in biobreeding diabetic rats. *Horm Metab Res*, 45: 326–328.
- Jouneaux, C., Mallat, A., Serradeil-Le Gal, C., Goldsmith, P., Hanoune, J., & Lotersztajn, S. (1994). Coupling of endothelin B receptors to the calcium pump and phospholipase C via Gs and GQ in rat liver. *J Biol Chem*, 269:1845–1851.
- Jousset, H., Frieden, M., & Demaurex, N. (2007). STIM1 knockdown reveals that storeoperated Ca^{2+} channels located close to sarco/endoplasmic Ca^{2+} ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 282: 11456–11464.
- Kawanabe, Y., & Nauli, S. (2005). Involvement of extracellular Ca^{2+} influx through voltage-independent Ca^{2+} channels in endothelin-1 function. *Cell Signal*, 17: 911–916.
- Kawanabe, Y., Hashimoto, N., & Masaki, T. (2002). Effects of Phosphoinositide 3-Kinase on the Endothelin-1-Induced Activation of Voltage-Independent Ca^{2+} Channels and Mitogenesis in Chinese Hamster Ovary Cells Stably Expressing EndothelinA Receptor. *Mol Pharmacol*, 62 (3) 756-761.
- Kawanabe, Y., Hashimoto, N., & Masaki, T. (2002). Extracellular Ca^{2+} influx and endothelin-1-induced intracellular mitogenic cascades in rabbit internal carotid artery vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 40(2): 307-14.
- Kawanabe, Y., Hashimoto, N., & Masaki, T. (2002a.). Ca^{2+} channels involved in endothelin-induced mitogenic response in carotid artery vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 282: C330–C337.
- Khodorova, A., Montmayeur, J., & Strichartz, G. (2009). Endothelin receptors and pain. The journal of pain: official journal of the American Pain Society. 2009;10:4–28. . *J Pain*, 10:4–28.

Bibliografía

- Kim, J., Lee, C., Park, H., Kim, H., So, H., Lee, K., y otros. (2006). Epidermal growth factor induces vasoconstriction through the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated mitogen-activated protein kinase pathway in hypertensive rats. *J Pharmacol Sci*, 101: 135–143.
- Kitazawa, T., & Kitazawa, K. (2012). Size-dependent heterogeneity of contractile Ca²⁺ sensitization in rat arterial smooth muscle. *J Physiol*, 590: 5401–5423.
- Kizub, I., Pavlova, O., Johnson, C., Soloviev, A., & Zholos, A. (2010). Rho kinase and protein kinase C involvement in vascular smooth muscle myofilament calcium sensitization in arteries from diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 159(8): 1724–1731.
- Klemm, D., Watson, P., Frid, M., Dempsey, E., Schaack, J., Colton, L., y otros. (2001). cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration. *J Biol Chem*, 276: 46132-46141.
- Kobilka, B., Dixon, R., Frielle, T., Dohlman, H., Bolanowski, M., Sigal, I., y otros. (1987). cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: A protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 46–50.
- Kobilka, B., Matsui, H., Kobilka, T., Yang-Feng, T., Francke, U., Caron, M., y otros. (1987). Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science*, 238: 650–6.
- Komori, S., & Bolton, T. (1990). Role of G-proteins in muscarinic receptor inward and outward currents in rabbit jejunal smooth muscle. *J Physiol*, 427: 395–419.
- Komori, S., Kawai, M., Takewaki, T., & Ohashi, H. (1992). GTP-binding protein involvement in membrane currents evoked by carbachol and histamine in guinea-pig ileal muscle. *J Physiol*, 450:105–126.
- Kopecky, B., Liang, R., & Bao, J. (2014). T-type calcium channel blockers as neuroprotective agents. *Pflugers Arch Eur J Physiol*, 466: 757.
- Kubo, T., Ibusuki, T., Chiba, S., Kambe, T., & Fukumori, R. (2002). Altered mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29: 537-543.

Bibliografía

- Kudryavtseva, O., Aalkjaer, C., & Matchkov, V. (2013). Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca²⁺-dependent transcription factors. *FEBSJ*, 280: 5488–5499.
- Kudryavtseva, O., Herum, K., Dam, V., Straarup, M., Kamaev, D., Boedtkjer, D., y otros. (2014). Downregulation of L-type Ca²⁺ channel in rat mesenteric arteries leads to loss of smooth muscle contractile phenotype and inward hypertrophic remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306: H1287-H1301.
- Kuga, T., Kobayashi, S., Hirakawa, Y., Kanaide, H., & Takeshita, A. (1996). Cell cycle dependent expression of L and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res*, 79(1): 14-9.
- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., y otros. (1997). Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, 272: 12257–12260.
- Lanner, J., Georgiou, D., Joshi, A., & Hamilton, S. (2010). Ryanodine receptors: Structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(11): a003996.
- Large, W. (2002). Receptor operated Ca²⁺ -permeable non-selective cation channels in vascular smooth muscle: A Physiologic Perspective. *J Cardiovasc Physiol*, 13: 493–501.
- Le Blanc, C., Mironneau, C., Barbot, C., Henaff, M., Bondeva, T., Wetzker, R., y otros. (2004). Regulation of vascular L-type Ca²⁺ channels by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Circ Res*, 95: 300–307.
- Lee, H., Won, K., Kim, J., Park, H., Kim, H., Roh, H., y otros. (2007). Endothelin-1 induces contraction via a Syk-mediated p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Sci*, 103: 427–433.
- Lei, S., Dryden, W., & Smith, P. (1998). Involvement of Ras/MAP kinase in the regulation of Ca²⁺ channels in adult bullfrog sympathetic neurons by nerve growth factor. *J Neurophysiol*, 80(3):1352-61.
- Leung, F., Yung, L., Yao, X., Laher, I., & Huang, Y. (2008). Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 153: 846–857.

Bibliografía

- Lin, A., Sun, H., Paudel, O., Lin, M., & Sham, J. (2016). Conformation of ryanodine receptor-2 gates store-operated calcium entry in rat pulmonary arterial myocytes. *Cardiovasc Res*, 111 (1): 94–104.
- Lipskaia, L., & Lompre, A. (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell*, 96: 55-68.
- Lipskaia, L., del Monte, F., & Lompré, A. (2005). Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat. *Circ. Res*, 97: 488–495.
- Lipskaia, L., Keuylian, Z., Blirando, K., Mougnot, N., Jacquet, A., Rouxel, C., y otros. (2014). Expression of sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) system in normal mouse cardiovascular tissues, heart failure and atherosclerosis. *BiochimBiophys Acta*, 1843: 2705-2718.
- Liu, Z., & Khalil, R. (2018). Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem Pharmacol*, 153: 91-122.
- Lovenberg, W., & Miller, R. (1990). Endothelin: a review of its effects and possible mechanisms of action. *Neurochem Res*, 15: 407–417.
- Lu, Y., Shioda, N., Han, F., Kamata, A., Shirasaki, Y., Qin, Z., y otros. (2009). DY-9760e inhibits endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy through inhibition of CaMKII and ERK activities. *Cardiovasc Ther*, 27: 17–27.
- Lu, Z., Jiang, Y., Xu, X., Ballou, L., Cohen, I., & Lin, R. (2007). Decreased L-type Ca²⁺ current in cardiac myocytes of type 1 diabetic akita mice due to reduced phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Diabetes*, 56: 2780–2789.
- Luo, G., Jamali, R., Cao, Y., Edvinsson, L., & Xu, C. (2006). Vascular endothelin ETB receptor-mediated contraction requires phosphorylation of ERK1/2 proteins. *Eur J Pharmacol*, 538: 124–131.
- Macrez, N., Mironneau, C., Carricaburu, V., Quignard, J., Babich, A., Czupalla, C., y otros. (2001). Phosphoinositide3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca (2+) channels. *Circ Res*, 89: 692–699.

Bibliografía

- Macrez-Leprêtre, N., Kalkbrenner, F., Schultz, G., & Mironneau, J. (1997). Distinct functions of Gq and G11 proteins in coupling alpha1-adrenoreceptors to Ca²⁺ release and Ca²⁺ entry in rat portal vein myocytes. *J Biol Chem*, 272(8): 5261-8.
- Manjarrés, I., Rodríguez-García, A., Alonso, M., & García-Sancho, J. (2010). The sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) is the third element in capacitative calcium entry. *Cell Calcium*, 5: 412-418.
- Marasciulo, F., Montagnani, M., & Potenza, M. (2006). Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr Med Chem*. 2006, 13: 1655–1665.
- Marshall, C. (1996). Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 8(2):197-204.
- Martin, S., Butcher, A., Berrow, N., Richards, M., Paddon, R., Turner, D., y otros. (2006). Phosphorylation sites on calcium channel alpha1 and beta subunits regulate ERK-dependent modulation of neuronal N-type calcium channels. *Cell Calcium*, 39(3): 275-92.
- Martínez, M., Randriamboavonjy, V., Ohlmann, P., Komasa, N., Duarte, J., Schneider, F., y otros. (2000). Involvement of protein kinase C, tyrosine kinases, and Rho kinase in Ca²⁺ handling of human small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H1228–H1238.
- Martinsen, A., Yerna, X., Rath, G., Gomez, E., Dessy, C., & Morel, N. (2012). Different effect of Rho kinase inhibition on calcium signaling in rat isolated large and small arteries. *J Vasc Res*, 49: 522–533.
- Masaki, T. (2004). Historical review: endothelin. *Trends Pharmacol Sci*, 25: 219-224.
- Masuo, M., Reardon, S., Ikebe, M., & Kitazawa, T. (1994). A novel mechanism for the Ca²⁺-sensitizing effect of protein kinase C on vascular smooth muscle: Inhibition of myosin light chain phosphatase. *J Gen Physiol*, 104: 265–286.
- Matchkov, V., Kudryavtseva, O., & Aalkjaer, C. (2012). Intracellular Ca²⁺ signalling and phenotype of vascular smooth muscle cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 110: 42-48.

Bibliografía

- Matsui, T., Takuwa, Y., Johshita, H., Yamashita, K., & Asano, T. (1991). Possible role of protein kinase C-dependent smooth muscle contraction in the pathogenesis of chronic cerebral vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab*, 11: 143-149.
- McFadzean, I., & Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 135 (1):1-13.
- McGrath, J. (2015). Localization of α -adrenoceptors: JR Vane Medal Lecture. *Br J Pharmacol*, 172(5): 1179–1194.
- McMullen, J., Shioi, T., Zhang, L. T., Sherwood, M., Kang, P., & Izumo, S. (2003). Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 14; 1.
- McNair, L., Salamanca, D., & Khalil, R. (2004). Endothelin-1 promotes Ca²⁺ antagonist-insensitive coronary smooth muscle contraction via activation of epsilon-protein kinase C. *Hypertension*, 43: 897–904.
- Meissner, G. (2017). The structural basis of ryanodine receptor ion channel function. *J Gen Physiol*, 149: 1065–1089.
- Meves, H. (1994). Modulation of ion channels by arachidonic acid. *Prog Neurobiol*, 43: 175-186.
- Miano, J. (2003). Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol*, 35: 577-593.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A., & Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113: 329-342.
- Misárková, E., Behuliak, M., Bencze, M., & Zicha, J. (2016). Excitation-Contraction Coupling and Excitation-Transcription Coupling in Blood Vessels: Their Possible Interactions in Hypertensive Vascular Remodeling. *Physiol Res*, 65: 173-191.
- Molkentin, J., & Dorn, G. (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, 63: 391–426.

Bibliografía

- Monti, M., Donnini, S., Giachetti, A., Mochly-Rosen, D., & Ziche, M. (2010). DeltaPKC inhibition or varepsilonPKC activation repairs endothelial vascular dysfunction by regulating eNOS post-translational modification. *Mol Cell Cardiol*, 48: 746–756.
- Morello, F., Perino, A., & Hirsch, E. (2009). Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res*, 82: 261–271.
- Morris, G., Nelson, C., Standen, N., Challiss, R., & Willets, J. (2010). Endothelin signalling in arterial smooth muscle is tightly regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *Cardiovasc Res*, 85(3): 424-33.
- Moumami, C., Gullikson, G., & Gaginella, T. (1992). Effect of endothelin-1 on guinea pig gallbladder smooth muscle in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 260: 549-553.
- Mulvany, M., Halpern, W. (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 41(1):19-26.
- Muslin, A. (2008). MAPK Signaling in Cardiovascular Health and Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Clin Sci (Lond)*, 115(7): 203–218.
- Naik, J., Xiang, L., & Hester, R. (2006). Enhanced role for RhoA-associated kinase in adrenergic-mediated vasoconstriction in gracilis arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290: R154–R161.
- Najwer, I., & Lilly, B. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV activates cysteine-rich protein 1 through adjacent CRE and CArG elements. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289: C785-C793.
- Narayanan, D., Adebisi, A., & Jaggar, J. (2012). Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302(11): H2190– H2210.
- Nelson, M., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L., Bonev, A., Knot, H., y otros. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*, 270(5236): 633–637.
- Nelson, M., Standen, M., Brayden, J., & Worley, J. (1988). Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature*, 336: 382-385.

Bibliografía

- Neylon, C. (1999). Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26:149–153.
- Nguyen, A., Thorin-Trescases, N., & Thorin, E. (2010). Working under pressure: coronary arteries and the endothelin system. *Am J Physiol*, 298: R1188–R1194.
- Nilsson, D., Gustafsson, L., Wackenfors, A., Gesslein, B., Edvinsson, L., Paulsson, P., y otros. (2008). Up-regulation of endothelin type B receptors in the human internal mammary artery in culture is dependent on protein kinase C and mitogen-activated kinase signaling pathways. *Cardiovasc Disord*, 8: 21.
- Nilsson, D., Wackenfors, A., Gustafsson, L., Ugander, M., Ingemansson, R., Edvinsson, L., y otros. (2008). PKC and MAPK signalling pathways regulate vascular endothelin receptor expression. *Eur J Pharmacol*, 580(1-2): 190-200.
- Nishimura, J., Moreland, S., Ahn, H., Kawase, T., More-Land, R., & Van Breemen, C. (1992). Endothelin increases myofilament Ca²⁺ sensitivity in α -toxin permeabilized rabbit mesenteric artery. *Circ. Res*, 71: 951–959.
- Nobe, K., & Paul, R. (2001). Distinct pathways of Ca²⁺ sensitization in porcine coronary artery: effects of Rho-related kinase and protein kinase C inhibition on force and intracellular Ca²⁺. *Circ Res*, 88: 1283–1290.
- Northcott, C., Hayflick, J., & Watts, S. (2005). Upregulated function of phosphatidylinositol-3-kinase in genetically hypertensive rats: a moderator of arterial hypercontractility. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32: 851–858.
- Northcott, C., Poy, M., Najjar, S., & Watts, S. (2002). Phosphoinositide 3-kinase mediates enhanced spontaneous and agonist-induced contraction in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Circ Res*, 91: 360–369.
- Novokhatska, T., Tishkin, S., Dosenko, V., Boldyriev, A., Ivanova, I., Strielkov, I., y otros. (2013). Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing. *Eur J Pharmacol*, 718.
- Nowycky, M., Fox, A., & Tsien, R. (1985). Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 316: 440-443.

Bibliografía

- Nyborg, N., Prieto, D., Benedito, S., & Nielsen, P. (1991). Endothelin-1-induced contraction of bovine retinal small arteries is reversible and abolished by nitrendipine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32(1): 27-31.
- Nystoriak, M., Nieves-Cintrón, M., Nygren, P., Hinke, S., Nichols, C., Chen, C., y otros. (2014). AKAP150 contributes to enhanced vascular tone by facilitating large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel remodeling in hyperglycemia and diabetes mellitus. *Circulation Research*, 114(4): 607–615.
- O'Brien, R., Robbins, R., & McMurtry, I. (1987). Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol*, 132: 263–70.
- Ohlstein, E., Horohovich, S., & Hay, D. (1989). Cellular Mechanisms Of Endothelin In Rabbit Aorta. *J Pharmacol Exp Ther*, 250: 548-555.
- Ok, S., Jeong, Y., Kim, J., Lee, S., Sung, H., Kim, H., y otros. (2011). c-Jun NH₂-terminal kinase contributes to dexmedetomidine-induced contraction in isolated rat aortic smooth muscle. *Yonsei Med J*, 52: 420–428.
- Okon, E., Chung, A., Rauniyar, P., Padilla, E., Tejerina, T., McManus, B., y otros. (2005). Compromised arterial function in human type 2 diabetic patient. *Diabetes*, 54: 2415–2423.
- Ortega-Mateo, A., & de Artiñano, A. (1997). Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res*, 36: 339–351.
- Parekh, A., & Putney, J. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 85(2): 757-81.
- Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., y otros. (2004). PI3K gamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and –independent effects. *Cell*, 118:375–387.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers-Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K., y otros. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22: 153–183.
- Perez-Reyes, E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, 83(1):117-61.

Bibliografía

- Pesic, A., Madden, J., Pesic, M., & Rusch, N. (2004). High blood pressure upregulates arterial L-type Ca²⁺ channels. Is membrane depolarization the signal? *Circ Res*, 94: e97–e104.
- Pfaffman, M., Ball, C., & Hilman, R. (1982). Insulin reversal of diabetes-induced inhibition of vascular contractility in the rat. *Am J Physiol*, 242: H490–H495.
- Pinho, J., Medeiros, M., Capettini, L., Rezende, B., Campos, P., Andrade, S., y otros. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase- δ up-regulates L-type Ca²⁺ currents and increases vascular contractility in a mouse model of type 1 diabetes. *Br J Pharmacol*, 161(7): 1458–1471.
- Pintérová, M., Karen, P., Kuneš, J., & Zicha, J. (2010). Role of nifedipine -sensitive sympathetic vasoconstriction in maintenance of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats: effect of Gi-protein inactivation by pertussis toxin. *J Hypertens*, 28: 969-978.
- Pintérová, M., Kuneš, J., & Zicha, J. (2011). Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiol Res*, 60: 381402 .
- Pipes, G., Creemers, E., & Olson, E. (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev*, 20: 1545-1556.
- Poburko, D., Liao, C., Van Breemen, C., & Demareux, N. (2009). Mitochondrial regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 104: 104–112.
- Pollock, D., Keith, T., & Highsmith, R. (1995). Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J*, 9: 1196–1204.
- Potier, M., Gonzalez, J., Motiani, R., Abdullaev, I., Bisailon, J., Singer, H., y otros. (2009). Evidence for STIM1-and Orai1-dependent store-operated calcium influx through I-CRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J*, 23: 2425-2437.
- Potts, L., Ren, Y., Lu, G., Kuo, E., Ngo, E., Kuo, L., y otros. (2012). Constriction of retinal arterioles to endothelin-1: requisite role of rho kinase independent of protein kinase C and L-type calcium channels. *Invest Ophthalmol Visc Sci*, 53: 2904–2912.

Bibliografía

- Pratt, P., Bonnet, S., Ludwig, L., Bonnet, P., & Rusch, N. (2002). Upregulation of L-type Ca²⁺ channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension*, 40: 214-219.
- Prieto, D., Contreras, C., & Sánchez, A. (2013). Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*, 11: 412–426.
- Prieto, D., Mulvany, M., & Nyborg, N. (1991). (+)-S-12967 and (-)-S-12968: 1,4-dihydropyridine stereoisomers with calcium channel agonistic and antagonistic properties in rat resistance arteries. *Br J Pharmacol*, 103: 1703–1708.
- Puceat, M., Hilal-Dandan, R., Strulovici, B., Brunton, L., & Brown, J. (1994). Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 269:16938–16944.
- Putney, J. (2009). Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev*, 231: 10–22.
- Quignard, J., Mironneau, J., Carricaburu, V., Fournier, B., Babich, A., Nurnberg, B., y otros. (2001). Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *J Biol Chem*, 276: 32545–32551.
- Quin-wen, C., Edvinsson, L., & Cang-Bao, X. (2009). Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. *BMC Cell Biology*, 10: 52 .
- Rakotoarisoa, L., Carricaburu, V., Leblanc, C., Mironneau, C., Mironneau, J., & Macrez, N. (2006). Angiotensin II-induced delayed stimulation of phospholipase C gamma1 requires activation of both phosphatidylinositol 3kinase gamma and tyrosine kinase in vascular myocytes. *J Cell Mol Med*, 10: 734–748.
- Rasmussen, H., Takuwa, Y., & Park, S. (1987). Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J*, 1: 177-185.
- Rebecchi, M., & Pentylala, S. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev*, 80:1291–1335.
- Richard, S. (2005). Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. *Drugs*, 65 (Suppl2):1-10.

Bibliografía

- Rockman, H., Koch, W., & Lefkowitz, R. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415: 206–12.
- Ruiz-Velasco, V., Zhong, J., Hume, J., & Keef, K. (1998). Modulation of Ca²⁺ channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res*, 82: 557–565.
- Rybin, V., Han, H., & Steinberg, S. (1996). G protein dependence of α 1-adrenergic receptor subtype action in cardiac myocytes. *G Proteins*, 29: 344–61.
- Sakata, K., Ozaki, H., Kwon, S., & Karaki, H. (1989). Effects of endothelin on the mechanical activity and cytosolic calcium levels of various types of smooth muscle. *Br J Pharmacol*, 98: 483–492.
- Salamanca, D., & R.A. Khalil, R. (2005). Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem. Pharmacol*, 1537–1547.
- Saleh, S., & Greenwood, I. (2005). Activation of chloride currents in murine portal vein smooth muscle cells by membrane depolarization involves intracellular calcium release. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288(1): C122–C131.
- Sánchez, A., Contreras, C., Climent, B., Gutiérrez, A., Muñoz, M., García-Sacristán, A., y otros. (2018). Impaired Ca²⁺ handling in resistance arteries from genetically obese Zucker rats: Role of the PI3K, ERK1/2 and PKC signaling pathways. *Biochem Pharmacol*, 152:114-128.
- Sánchez, A., Martínez, P., Muñoz, M., Benedito, S., García-Sacristán, A., Hernández, M., y otros. (2014). Endothelin-1 contributes to endothelial dysfunction and enhanced vasoconstriction through augmented superoxide production in penile arteries from insulin-resistant obese rats: role of ET(A) and ET(B) receptors. *Br J Pharmacol*, 171(24): 5682-9.
- Santiago, E., Climent, B., Muñoz, M., García-Sacristán, A., Rivera, L., & Prieto, D. (2015). Hydrogen peroxide activates store-operated Ca(2+) entry in coronary arteries. *Br J Pharmacol*, 172: 5318–5332.

Bibliografía

- Savalli, N., Pantazis, A., Sigg, D., Weiss, J., Neely, A., & Olcese, R. (2016). The $\alpha_2\delta$ -1 subunit remodels CaV1.2 voltage sensors and allows Ca²⁺ influx at physiological membrane potentials. *J Gen Physiol*, 148(2): 147–159.
- Schneider, M., Boesen, E., & Pollock, D. (2007). Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:731–759.
- Searls, Y., Loganathan, R., & Stehno-Bittel, L. (2010). Intracellular Ca²⁺ regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia. *Cardiovasc Diabetol*, 9: 8.
- Shaw, L., Ohanian, J., & Heagerty, A. (1997). Calcium sensitivity and agonist-induced calcium sensitization in small arteries of young and adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 30(3 Pt 1): 442-8.
- Shimamoto, H., Shimamoto, Y., Chiu-Yin Kwan, C., & ED., E. (1992). Participation of protein kinase C in endothelin-1-induced contraction in rat aorta: studies with a new tool, calphostin C. *Br. J. Pharmacol*, 107: 282-287.
- Smani, T., Calderón-Sanchez, E., Gómez-Hurtado, N., Fernández-Velasco, M., Cachofeiro, V., Lahera, V., y otros. (2010). Mechanisms underlying the activation of L-type calcium channels by urocortin in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 87: 459–466.
- Smani, T., Zakharov, S., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E., & Bolotina, V. (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol*, 6: 113-120.
- Somlyo, A., & Somlyo, A. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, 372(6503): 231-6.
- Somlyo, A., & Somlyo, A. (2000). Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*, 522:177–185.
- Somlyo, A., & Somlyo, A. (2003). Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 83(4):1325-58.

Bibliografía

- Somlyo, A., Wu, X., Walker, L., & Somlyo, A. (1999). Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 134: 201-34.
- Sorrentino, V., & Volpe, P. (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol Sci*, 14: 98-103.
- Sudano, I., Viridis, A., Taddei, S., Spieker, L., Corti, R., Noll, G., y otros. (2007). Chronic treatment with long-acting nifedipine reduces vasoconstriction to endothelin-1 in essential hypertension. *Hypertension*, 49: 285–290.
- Sugiyama, T., Yoshizumi, M., Takaku, F., Urabe, H., Tsukakoshi, M., Kasuya, T., y otros. (1986). The elevation of the cytoplasmic calcium ions in vascular smooth muscle cells in SHR—measurement of the free calcium ions in single living cells by lasermicrofluorospectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*, 141: 340-345.
- Sun, P., Enslin, H., Myung, P., & Maurer, R. (1994). Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 8, 8: 2527-2539.
- Sureshan, K., Riley, A., Rossi, A., Tovey, S., Dedos, S., Taylor, C., y otros. (2009). Activation of IP₃ receptors by synthetic bisphosphate ligands. *Chem Commun*, 1204.
- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., & Kozasa, T. (2003). Gα₁₂ activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 733–738.
- Szewczyk, M., Davis, K., Samson, S., Simpson, F., Rangachari, P., & Grover, A. (2007). Ca²⁺-pumps and Na⁺–Ca²⁺-exchangers in coronary artery endothelium versus smooth muscle. *J Cell Mol Med*, 11(1): 129–138.
- Takahashi, E., Fukuda, K., Miyoshi, S., Murata, M., Kato, T., Ita, M., y otros. (2004). Leukemia inhibitory factor activates cardiac L-Type Ca²⁺ Channels via Phosphorylation of Serine 1829 in the rabbit cav1.2 Subunit. *Circ Res*, 94: 1242–1248.
- Tanaka, Y., Imai, T., Igarashi, T., Takayanagi, K., Otsuka, K., Yamaki, F., y otros. (2000). Comparison of the Ca²⁺ entry channels responsible for mechanical responses of

Bibliografía

- guinea-pig aorta to noradrenaline and thapsigargin using SK&F 96365 and LOE 908. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, 362:160–168.
- Tasker, P., Taylor, C., & Nixon, G. (2000). Expression and distribution of InsP (3) receptor subtypes in proliferating vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(3): 907–912.
- Terman, B., Riek, R., Grodski, A., Hess, H., & Graham, R. (1990). Identification and structural characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol*, 37: 526–34.
- Thorin, E., & Webb, D. (2010). Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Arch*, 459: 951–95.
- Toker, A., & Cantley, L. (1997). Signaling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, 387:673–676.
- Touyz, R., El Mabrouk, M., He, G., Wu, X., & Schiffrin, E. (1999). Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 84: 505–515.
- Treisman, R. (1992.). The serum response element. *Trends Biochem Sci*, 17: 423-426.
- Tsien, R., & Tsien, R. (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annual Review of Cell Biology*, 6: 715-760.
- Turban, S., & Hajduch, E. (2011). Protein kinase C isoforms: mediators of reactive lipid metabolites in the development of insulin resistance. *FEBS Lett*, 585: 269–274.
- Tykocki, N., & Watts, S. (2010). The interdependence of Endothelin-1 and Calcium: A Review. *Clin Sci*, 119(9): 361–372.
- Ungvari, Z., Pacher, P., Kecskemeti, V., Papp, G., Szollár, L., & Koller, A. (1999). Increased myogenic tone in skeletal muscle arterioles of diabetic rats. Possible role of increased activity of smooth muscle Ca²⁺ channels and protein kinase C. *Cardiovasc Res*, 43: 1018–1028.
- Ureña, J., del Valle-Rodríguez, A., & López-Barneo, J. (2007). Metabotropic Ca²⁺ channel-induced calcium release in vascular smooth muscle. *Cell Calcium*, 42(4-5): 513-20.

Bibliografía

- Vaithianathan, T., Narayanan, D., Asuncion-Chin, M., Jeyakumar, L., Liu, J., Fleischer, S., y otros. (2010). Subtype identification and functional characterization of ryanodine receptors in rat cerebral artery myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299(2): C264–C278.
- Vallot, O., Combettes, L., Jourdon, P., Inamo, J., Marty, I., Claret, M., y otros. (2000). Intracellular Ca²⁺ handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20: 1225-1235.
- Van Renterghem, C., Vigne, P., Barhanin, J., Schmid-Alliana, A., Frelin, C., & Lazdunski, M. (1988). Molecular mechanism of action of the vasoconstrictor peptide endothelin. *Biochem Biophys Res Commun*, 157: 977–985.
- Van-Petegem, F., Chatelain, F., & Minor, D. (2005). Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain–Ca²⁺/calmodulin complex. *Nat Struct Mol Biol*, 12(12): 1108–1115.
- Viard, P., Butcher, A., Halet, G., Davies, A., Nürnberg, B., Hebllich, F., y otros. (2004). PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci*, 7(9):939-46.
- Vignon-Zellweger, N., Heiden, S., Miyauchi, T., & Emoto, N. (2012). Endothelin and endothelin receptors in the renal and cardiovascular systems. *Life Sci*, 91(13-14): 490–500.
- Villalba, N., Contreras, C., Hernández, M., García-Sacristán, A., & Prieto, D. (2011). Impaired Ca²⁺ handling in penile arteries from prediabetic Zucker rats: involvement of rho kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300: H2044–H2053.
- Villalba, N., Stankevicius, E., Garcia-Sacristán, A., Simonsen, U., & Prieto, D. (2007). Contribution of both Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization to the alpha1 adrenergic vasoconstriction of rat penile small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1157–H116, 292: H1157–H116.
- Villalba, N., Stankevicius, E., Simonsen, U., & Prieto, D. (2008). Rho kinase is involved in Ca²⁺-entry of rat penile small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H1923–H1932.

Bibliografía

- Wackenfors, A., Emilson, M., Ingemansson, R., Hortobagyi, T., Szok, D., Tajti, J., y otros. (2004b). Ischemic heart disease induces upregulation of endothelin receptor mRNA in human coronary arteries. *Eur J Pharmacol*, 484: 103–109.
- Wagner, O., Christ, G., Wojta, J., Vierhapper, H., Parzer, S., Nowotny, P., y otros. (1992). Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 267(23):16066-8.
- Wamhoff, B., Bowles, D., McDonald, O., Sinha, S., Somlyo, A., Somlyo, A., y otros. (2004). L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a Rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circ Res*, 95: 406-414.
- Wang, Y., Yoshioka, K., Azam, M., Takuwa, N., Sakurada, S., Kayaba, Y., y otros. (2006). Class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. *Biochem J*, 394: 581–592.
- Whitmarsh, A., & Davis, R. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, 74: 589–607.
- Wilkerson, M. H., Bonev, A., & Nelson, M. (2006). Inositol trisphosphate receptor calcium release is required for cerebral artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H240H247.
- Woodcock, E. (2007). Roles of α 1a- and α 1b-adrenoceptors in heart: insights from studies of genetically modified mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(9): 884-8.
- Woodsome, T., Polzin, A., Kitazawa, K., Eto, M., & Kitazawa, T. (2006). Agonist- and depolarization-induced signals for myosin light chain phosphorylation and force generation of cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Sci*, 119(Pt 9): 1769-80.
- Wray, S., Burdyga, T., & Noble, K. (2005). Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium*, 38: 397–407.
- Wu, D., Katz, A., Lee, C., & Simon, M. (1992). Activation of phospholipase C by α 1-adrenergic receptors is mediated by the α subunits of Gq family. *J Biol Chem*, 267: 25798-25802.

Bibliografía

- Wu, J., Yan, Z., Li, Z., Yan, C., Lu, S., Dong, M., y otros. (2015). Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science*, 350(6267): aad2395.
- Wu, M., Buchanan, J., Luik, R., & Lewis, R. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*, 174: 803-813.
- Xavier, F., Davel, A., Rossoni, L., & Vassallo, D. (2003). Time-dependent hyperreactivity to phenylephrine in aorta from untreated diabetic rats: role of prostanoids and calcium mobilization. *Vascul Pharmacol*, 40(1):67-76.
- Yamakawa, T., Tanaka, S., Numaguchi, K., Yamakawa, Y., Motley, E., Ichihara, S., y otros. (2000). Involvement of Rho-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 35(1 Pt 2): 313-318.
- Yang, L., Doshi, D., Morrow, J., Katchman, A., Chen, X., Steven, O., y otros. (2009). Protein Kinase C Isoforms Differentially Phosphorylate Cav1.2 α 1c. *Biochemistry*, 48(28): 6674–6683.
- Yang, L., Liu, G., Zakharov, S., Morrow, J., Rybin, V., Steinberg, S., y otros. (2005). Ser1928 is a common site for Cav1.2 phosphorylation by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem*, 280: 207–214.
- Yang, M., Ruan, J., Voller, M., Schalken, J., & Michel, M. (1999). Differential regulation of human α 1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*, 359: 439–46.
- Yue, T., Gu, J., Wang, C., Alastair, D., John, C., Rosanna, C., y otros. (2000). Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*, 275: 37895–37901.
- Zamponi, G., Striessnig, J., Koschak, A., & Dolphin, A. (2015). The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev*, 67(4): 821–870.

Bibliografía

- Zeng, Q., Li, X., Zhong, G., Zhang, W., & Sun, C. (2009). Endothelin-1 induces intracellular $[Ca^{2+}]$ increase via Ca^{2+} influx through the L-type Ca^{2+} channel, Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and a pathway involving ETA receptors, PKC, PKA and AT1 receptors in cardiomyocytes. *Life Sci*, 52: 360–370.
- Zeng, X., Keyser, B., Li, M., & Sikka, S. (2005). T-type (α_1G) low voltage-activated calcium channel interactions with nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and regulation of calcium homeostasis in human cavernosal cells. *J Sex Med*, 2(5): 620-30; discussion 630-3.
- Zhang, X., Iwamuro, Y., Enoki, T., Okazawa, M., Lee, K., Komuro, T., y otros. (1999). Pharmacological characterization of Ca^{2+} entry channels in endothelin-1-induced contraction of rat aorta using LOE 908 and SK&F 96365. *Br J Pharmacol*, 127: 1388–1398.
- Zhao, G., Adebisi, A., Blaskova, E., Xi, Q., & Jaggar, J. (2008). Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate UTP-induced cation currents, Ca^{2+} signals, and vasoconstriction in cerebral arteries. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(5): C1376–C1384.
- Zhou, C., & Wu, S. (2006). T-type calcium channels in pulmonary vascular endothelium. *Microcirculation*, 13(8): 645-56.
- Zhou, H., Nakamura, T., Matsumoto, N., Hisatsune, C., Mizutani, A., Iesaki, T., y otros. (2008). Predominant role of type 1 IP₃ receptor in aortic vascular muscle contraction. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(1): 213–219.