

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS CONTRÁCTILES DE LA
MUSCULATURA LISA VASCULAR EN ARTERIAS
MESENTÉRICAS HUMANAS Y SU MODIFICACIÓN POR EL
ENVEJECIMIENTO : PAPEL DEL RETÍCULO
SARCOPLÁSMICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Jorge Navarro Dorado

Bajo la dirección de los doctores

Teresa Tejerina Sánchez
Santiago Redondo Blasco

MADRID, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. FARMACOLOGÍA**



**T
E
S
I
S
D
O
C
T
O
R
A
L**

**J
O
R
G
E
N
A
V
A
R
R
O
D
O
R
A
D
O**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
CONTRÁCTILES DE LA MUSCULATURA LISA
VASCULAR EN ARTERIAS MESENTÉRICAS
HUMANAS Y SU MODIFICACIÓN POR EL
ENVEJECIMIENTO. PAPEL DEL RETÍCULO
SARCOPLÁSMICO**

TESIS DOCTORAL

JORGE NAVARRO DORADO

2013

MADRID, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. DE FARMACOLOGÍA



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
CONTRÁCTILES DE LA MUSCULATURA LISA
VASCULAR EN ARTERIAS MESENTÉRICAS
HUMANAS Y SU MODIFICACIÓN POR EL
ENVEJECIMIENTO. PAPEL DEL RETÍCULO
SARCOPLÁSMICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

JORGE NAVARRO DORADO

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DPTO. DE FARMACOLOGÍA



**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS CONTRÁCTILES DE LA
MUSCULATURA LISA VASCULAR EN ARTERIAS
MESENTÉRICAS HUMANAS Y SU MODIFICACIÓN POR EL
ENVEJECIMIENTO. PAPEL DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO**

TESIS DOCTORAL

DOCTORADO EUROPEO EN FARMACOLOGÍA Y TERAPEÚTICA HUMANA

DIRECTORES

Dra. TERESA TEJERINA SANCHEZ

Dr. SANTIAGO REDONDO BLASCO

JORGE NAVARRO DORADO

Madrid, 2013



TERESA TEJERINA SÁNCHEZ, CATEDRÁTICA DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS CONTRÁCTILES DE LA MUSCULATURA LISA VASCULAR EN ARTERIAS MESENTÉRICAS HUMANAS Y SU MODIFICACIÓN POR EL ENVEJECIMIENTO. PAPEL DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO” constituye un trabajo original de investigación, realizado bajo mi supervisión, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del mismo modo, se autoriza su presentación por parte del candidato, Jorge Navarro Dorado, para optar al título de Doctor Europeo en Farmacología y Terapéutica Humana.

Teresa Tejerina Sánchez,



SANTIAGO REDONDO BLASCO, DOCTOR-COLABORADOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DE LOS MECANISMOS CONTRÁCTILES DE LA MUSCULATURA LISA VASCULAR EN ARTERIAS MESENTÉRICAS HUMANAS Y SU MODIFICACIÓN POR EL ENVEJECIMIENTO. PAPEL DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO” constituye un trabajo original de investigación, realizado bajo mi supervisión, en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Del mismo modo, se autoriza su presentación por parte del candidato, Jorge Navarro Dorado, para optar al título de Doctor Europeo en Farmacología y Terapéutica Humana.

Santiago Redondo Blasco,

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria PI080920 y por la Red Temática de Investigación Cardiovascular RECAVA RD06/0014/1007 ambos del Ministerio de Sanidad.

A Cris. Cualquier cosa que escribo me resulta escasa para demostrarte mi
agradecimiento y todo lo que siento por ti, te quiero.
A mis padres, porque representáis todo lo que soy y me habéis dado todo en la
vida. Nunca podré agradeceréoslo completamente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer siempre me ha parecido algo fácil (me considero un chico bien educado...), pero una vez que te pones, crees que te faltará alguien o que no todos sentirán que les has dedicado el espacio o la atención que esperaban. Sólo pedirlos disculpas porque mi memoria no es lo mejor que hay, muchos lo sabéis, pero pensad que aparezcáis o no y donde o como, no importa, os estoy tremendamente agradecido.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora de tesis la Dra. Teresa Tejerina por permitirme realizar la tesis doctoral en su laboratorio y ayudarme en todo lo que ha estado en su mano para poder llegar a este momento, además de por el trato personal que me ha dado desde el principio, Maite, muchísimas gracias por todo.

Querría agradecer al Dr. Santiago Redondo, codirector de la presente tesis doctoral, aunque ante todo, compañero y amigo. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tu ayuda con esta tesis y por los buenos momentos que hemos pasado.

A mis dos compis de laboratorio: Marta muchísimas gracias por estos 5 años, que se dice pronto, por tu ayuda y compañía. Úrsula, muchas gracias por todo lo que me has ayudado desde que llegaste y por tu alegría y espontaneidad, espero que os vaya todo muy bien, os lo merecéis.

Me gustaría dar las gracias al Departamento de Farmacología por permitirme realizar la tesis aquí, a todos los profesores y al personal que me ha ayudado en todo lo que ha podido, gracias María Elena, Manolo, María Luisa y especialmente a Fernando Ortego por estar siempre dispuesto a echar una mano y por hacerme pasar buenos momentos. También querría agradecer la compañía de tantos y tantos becarios y no tan becarios que han pasado por el departamento y sobre todo por el comedor y por las salidas nocturnas/fiestas departamentales, gracias a los Hombres de Farma (que buenas sesiones...), a las ayudas, conocimientos y charcarrillos varios de Borja y Javi, y a las charlas fikis (más "tronianas" que otra cosa) con el Robel, Andrés y Nieves (Blot Masters, muchas gracias por vuestra ayuda), Tamara e Iciar. Gracias también a Karina y Ara, Pepe, Macarena (bonita tu!!), Mari, Iván, Isaac (cuanto tiempo viéndonos...),

Ana, Víctor, Mayca, Elia, Ana, Franchi y Merche, Javi, Carmen, Laura, Dani y Rachele, Sandra y Noe (vaya congresito...), Adriana, Marta e Irene y por último aunque ya no esté, a Noemí que hizo de chofer durante un buen periodo de tiempo y sobre todo de confidente y amiga. En fin, a todos los que formáis parte del departamento, los que ya os habéis ido y los que estáis entrando.

I would specially like to thank Professor Cornelis van Breemen for accepting me at his lab in Vancouver and teaching me about science. Thank you Nick, Mitra, Sahar, Harley and Julia for all your help and company.

Also I would like to thank Professor Mark Evans for accepting me at his lab in Edinburgh, for all what he has taught me and for his kindness and being so accessible. Thank you Nicole, Olu, Ejaife and Carol (thanks for taking care of my finger).

Sin la ayuda del Dr. Mauricio García Alonso y todos los médicos y enfermeras del Servicio de Cirugía II del Hospital Clínico San Carlos, esta tesis no podría haber salido adelante, muchas gracias.

Me gustaría agradecer al Centro de Microscopía y Citometría de la U.C.M, en especial a Agustín y Marisa por su inestimable ayuda con el último procesamiento de las muestras y todo el tiempo que hemos estado encerrados sacando fotos de microscopía electrónica. Y por supuesto a Luis y Alfonso que me ayudaron con la microscopía confocal y me buscaron una solución para poder ir cuando pudiera.

Quiero agradecer al Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia donde me inicié en la investigación. A todos aquellos que me soportaron y siguen soportándome, muchas gracias amigos, y en especial a Tito, gracias por instruirme y ayudarme tanto.

Y ahora me voy a centrar en todo aquello que es más importante en la vida para mí, la familia y los amigos. Pequeñita, tu ya has tenido tu parte, no se si la mejor pero sin duda desde el corazón, Padres lo mismo os digo. Pero antes que los padres siempre están los abuelos, no se si por importancia, pero ya sabemos que sin unos no estarían los otros, por eso me gustaría daros las gracias abuelos, soy un cuarto de cada uno de vosotros y aunque alguno ya no esté, siempre pienso en vosotros y sois una parte de mi. Y en este apartado, Muchas Gracias familia, tíos, primos y sobrinos (o lo que seáis según las reglas

genéticas), porque siempre me ha encantado veros, que me ayudéis y ayudaros y sobre todo estar con vosotros. Por último, Kiro, te hecho de menos.

Y ya los últimos aunque no por ello menos importantes, y por que aquí me puedo soltar más. Espero no olvidarme de ninguno pero vamos, que sino os leáis el primer párrafo de nuevo. Amigos biólogos, habéis sido lo mejor de la carrera, Anita, Ali, Marta, Manu y Max, Pauli, Aran, H y Leti, gracias. Especialmente nombrar a aquellos que sobrevivieron desde los inicios, para los grandes (Jebi, aunque algo más escuchimirriao), para los pequeños (Meryyyy), para la que ha tenido mil etapas distintas (Soni), para los que son iguales (gemelos Axel e Iván, he montado todo este rollo solo para poder agradecerlos así, como os gusta...) y para Paloma y Carmen, ¿podremos cumplir lo de aquel papel algún día?

Para los Walsh padres e hijas casi todas, que vacaciones y que comidas familiares, muchas gracias por vuestra forma de ser.

A la gente del pueblo, que deciros, que sin vosotros no se me habrían hecho tan amenas las horas muertas por Garganta, muchas gracias a todos de verdad.

A Arantxa, Rafa, Allende, Tonio y Candela, gracias por vuestra alegría y compañía.

A Carmela, Carliños, Sarita, Beñat y Cris gracias por esas fiestas y por estar ahí.

Y a la gente del equipo de futbol que me hizo pasármelo tan bien yendo a jugar tan lejos y con esas cenas, sobre todo a los de las particulares, vosotros sabéis quienes digo, muchas gracias gente.

Voy a acabar (que vaya rollo, pero en fins, de ciento y muchas páginas que os leáis 3 ¿no es tanto no?) con el grupo de biólogos y no tan biólogos que os habéis convertido en mucho más que eso, sois lo que hace que todo merezca la pena: Peri e Irene gracias por vuestra ayuda con la estadística, darle formato a la tesis y todas esas cosas con las que os hago gastar tanto tiempo, es un placer tener a alguien siempre ahí, muchas gracias por vuestros consejos y por esta amistad que cada día me hace ver la parte buena de todo. Calamar, metal bro, espero que avancemos con lo que sea que venga luego y sea juntos por mucho tiempo (plonk, plonk, flashhhhhh, nunca me volverás a verte chocar así...jejeje), Tukitú en fins, se te echa de menos pero alegran mucho tus visitas, lo mismo

tenemos que empezar a coordinarnos para vernos más aquí y allí. Inesika y Alfonso, la rubiez más alegre y amigable y la sorna en su quinta esencia, vaya parejita, es un placer teneros tan cerca siempre. Crispis y Adelilla, habéis dado un punto más de alegría y simpatía al grupo, gracias. Rebe, que gusto verte más, sigue así de contenta aunque no te juntes mucho con la Cris que no hay quien os aguante....Ale (plonk, plonk, plonk), que decirte, portas taaanto metal que es un placer juntarnos todos para hacer una ale-ación. Loren (clonk) y Schumi, espero que me llevéis de fiesta ahora sí, más a menudo gracias chavales. Maripi (me abstendré de llamarte por tu apodo esta vez, solo diré que gracias por hacerme de chofer...jajaj) y Gorka (mi Freddy Mercury preferido), gracias par de dos, que vaya tela las que liáis. Jorge (contigo no puedo gordito cabrón, eres un crack en todos los sentidos) y Marisa (ayyy monitoraaaa) sois a lo que una pareja puede aspirar, Nurin (eres una luchadora) y Oscar, y Sofi y Samu. En fin, a todos vosotros muchísimas gracias por ser como sois y por estar ahí.

ABREVIATURAS

- 2-APB: 2-aminoetoxidifenilborato
- AM: arteria mesentérica
- APS: amonio persulfato
- Ca^{2+} : calcio
- $[\text{Ca}^{2+}]_i$: concentración de calcio intracelular
- CaCl_2 : cloruro cálcico
- CaM: calmodulina
- CBP: proteínas de unión a calcio
- CICR: liberación de calcio inducida por calcio
- CMLV: célula muscular lisa vascular
- CPA: ácido ciclopiazónico
- CPI-17: inhibidor de la fosfatasa potenciado por proteína kinasa C
- DAG: diacilglicerol
- DDH_2O : agua destilada.
- DMSO: dimetil sulfóxido.
- EDTA: ácido etilendiaminotetracético
- GAP: proteínas activadoras de GTPasa
- GDI: inhibidor de la disociación de los nucleótidos de guanina
- GDP: guanosina bifosfato
- GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina
- GTP: guanosina trifosfato
- H^+ : hidrógeno
- HA: 1-(5-isoquinolinilsulfonil)-homopiperazina dihidroclorida, HA-1077
- IICR: liberación de calcio inducida por inositol-(1,4,5)-trifosfato
- IP_3 : inositol-(1,4,5)-trifosfato
- IP_3R : canal de calcio activado por IP_3
- K^+ : potasio
- KBR: 2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)fenyl]ethyl]isotiourea, KB-R7943
- KCl: cloruro potásico
- MgCl_2 : cloruro magnésico
- MLC20: cadena ligera (20 kD) de la miosina

- MLCK : kinasa de la cadena ligera de miosina
- MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de miosina
- MP: membrana plasmática
- Na⁺: sodio
- [Na⁺]_i: concentración de sodio intracelular
- NaCl: cloruro sódico
- NCX: bomba de intercambio sodio/calcio
- Phe: fenilefrina
- PKC: proteína kinasa C
- PLC: fosfolipasa C
- PMCA: bomba ATPasa de Ca²⁺ del plasmalema
- ROCC: canal de calcio activado por receptor
- ROI: región de interés
- RS: retículo sarcoplásmico
- RYR: canal de rianodina
- SDS: dodecil sulfato sódico
- SERCA: bomba ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico
- SKF: 1- β -[3-(4-metoxifenil)propoxy]-4-metoxifenetil} -1H- imidazol, SK-F96365
- SOCC: canal de calcio activado por almacenamiento
- SSF: solución salina fisiológica
- TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina
- VOCC: canal de calcio activado por voltaje

ÍNDICE

I. Introducción	1
1. ARTERIAS	3
1.1 Procedencia de las arterias	3
1.2 Estructura arterial	3
1.2.1 Íntima	3
1.2.2 Media.....	4
1.2.3 Adventicia.....	5
2. CALCIO	6
2.1 Homeostasis del calcio.....	8
2.1.1 Entrada de calcio extracelular a través de canales	10
2.1.2 Intercambio de iones a través de la membrana plasmática.....	12
2.1.3 Transporte activo al espacio extracelular.....	13
2.1.4 Transporte al interior mitocondrial y nuclear.....	14
2.1.5 Transporte activo al interior retículo sarcoplásmico y proteínas de unión a calcio.....	15
2.2 Retículo sarcoplásmico	18
2.2.1 Canales de liberación y bombas de internalización de calcio	19
2.2.1.1 Canales de rianodina	19
2.2.1.2 Canales activados por inositol trifosfato.....	20
2.2.1.3 Bombas de internalización de calcio.....	21
2.2.2 Mecanismos de liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico.....	21

2.2.3 Señales elementales de calcio desde el retículo sarcoplásmico.....	22
--	----

3. REGULACIÓN DEL TONO DEL MÚSCULO LISO

VASCULAR.....	25
----------------------	-----------

3.1 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular	25
---	-----------

3.1.1 Acoplamiento excitación-contracción.....	26
---	-----------

3.1.1.1 Acoplamiento electromecánico.....	26
---	----

3.1.1.2 Acoplamiento farmacomecánico	27
--	----

3.1.2 Contracción por sensibilización al calcio	27
--	-----------

3.1.2.1 Regulación por la familia Rho.....	28
--	----

3.2 Mecanismo de relajación del músculo liso vascular.....	30
---	-----------

4. EDAD Y OTROS FACTORES	31
---------------------------------------	-----------

4.1 Edad.....	31
---------------	----

4.2 Factores patológicos.....	32
-------------------------------	----

II. Objetivos	37
----------------------------	-----------

III. Material y métodos	41
--------------------------------------	-----------

1. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	44
---	-----------

1.1 Protocolo de disección, montaje y normalización	44
---	----

1.2 Protocolo experimental	45
----------------------------------	----

1.3 Productos utilizados.....	46
-------------------------------	----

1.3.1 Líquidos nutricios	46
--------------------------------	----

1.3.2 Reactivos	47
-----------------------	----

1.4 Análisis de los resultados.....	48
-------------------------------------	----

2. ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL CON REACTIVIDAD VASCULAR	48
2.1 Protocolo de disección, montaje y normalización.....	48
2.2 Protocolo experimental.....	50
2.3 Productos utilizados	50
2.4 Análisis de los resultados	50
3. ESTUDIO ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	51
3.1 Protocolo de disección y preparación de las muestras	51
3.2 Protocolo de obtención de imágenes	52
3.3 Productos utilizados	57
3.4 Análisis de los resultados	57
4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RHO A, ROCKS I/II Y P-MYPT1/MYPT1 POR WESTERN BLOTTING	58
4.1 Protocolo de obtención de células	58
4.2 Protocolo experimental y realización de western blotting.....	59
4.3 Productos utilizados	62
4.3.1 Geles	62
4.3.2 Soluciones.....	63
4.3.4 Reactivos	64
4.4 Análisis de los resultados	66
IV. Resultados	69

1. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR.....	71
1.1 Efecto de 2-APB	72
1.2 Efecto de CPA	74
1.3 Efecto de HA	75
1.4 Efecto de KBR.....	77
1.5 Efecto de Nifedipina	78
1.6 Efecto de SKF	80
1.7 Posibles efectos de los vasodilatadores según sexo y enfermedades de los pacientes	81
2. ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL CON REACTIVIDAD VASCULAR.....	85
2.1 Efecto de 2-APB	86
2.2 Efecto de CPA	90
2.3 Efecto de HA	94
2.4 Efecto de Nifedipina	98
3. ESTUDIO ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRONICA.....	102
4. EXPRESION DE PROTEINAS RHO A, ROCKS I/II Y P-MYPT1/MYPT1 POR WESTERN BLOTTING	105
4.1 Expresión de Rho A, ROCK I y II.....	106
4.1.1 Expresión de Rho A	106
4.1.2 Expresión de ROCK I y II	107
4.2 Expresión de P-MYPT1/MYPT1	108

4.2.1 Expresión de PMYPT1/MYPT1 según la edad	108
4.2.2 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 17 años.....	109
4.2.3 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 35 años.....	110
4.2.4 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 52 años.....	112
4.2.5 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 62 años.....	113
4.2.6 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 77 años.....	115
4.2.7 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 85 años.....	116
4.2.8 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en el conjunto de los pacientes	118
V. Discusión	119
1. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR	121
2 y 3. ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL CON REACTIVIDAD VASCULAR. Y ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	125
4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RHO A, ROCKS I/II Y P-MYPT1/MYPT1 POR WESTERN BLOTTING	129
VI. Conclusiones	133
English summary	137
I. Introduction	139
1. ARTERIES	141
1.1 Origin of the arteries	141
1.2 Arterial structure	141
1.2.1 Intima	141

1.2.2 Media	141
1.2.3 Adventitia	141
2. CALCIUM	142
2.1 Calcium homeostasis	142
2.1.1 Calcium entry across channels.....	143
2.1.2 Ion exchange through plasma membrane	144
2.1.3 Active transport to the extracellular space	144
2.1.4 Internal mitochondrial and nuclear transport.....	144
2.1.5 Active transport to the sarcoplasmic reticulum interior, and calcium binding proteins	145
2.2 Sarcoplasmic reticulum.....	146
2.2.1 Release channels and internalization calcium pumps.....	146
2.2.1.1 Ryanodine channels.....	146
2.2.1.2 Inositol triphosphate activated channels.....	147
2.2.1.3 Internalization calcium pumps	147
2.2.2 Sarcoplasmic reticulum calcium release mechanisms.....	147
2.2.3 Sarcoplasmic reticulum elementary signals.....	147
3. VASCULAR SMOOTH MUSCLE TONE REGULATION	149
3.1 Vascular smooth muscle contraction mechanism	149
3.1.1 Excitation-contraction coupling.....	149
3.1.1.1 Electromechanical coupling.....	149
3.1.1.2 Pharmacomechanical coupling.....	150
3.1.2 Calcium sensitization contraction	150

3.1.2.1 Rho family regulation	150
3.2 Vascular smooth muscle relaxation mechanism	151
4. AGEING AND PATHOLOGICAL FACTORS	151
4.1. Ageing	151
4.2 Pathological factors	151
II. Objectives	153
III. Material and methods	157
1. VASCULAR REACTIVITY STUDIES	159
1.1. Dissection, mounting and normalization protocol.....	159
1.2. Experimental protocol.....	159
1.3. Products.....	160
1.3.1. Nutrient liquids.....	160
1.3.2. Reactives	160
1.4. Results analysis	160
2. CONFOCAL MICROSCOPY AND VASCULAR REACTIVITY STUDIES	161
2.1. Dissection, mounting and normalization protocol.....	161
2.2. Experimental protocol.....	161
2.3. Products.....	161
2.4. Results analysis	161
3. ELECTRON MICROSCOPY STRUCTURAL STUDY	162
3.1. Dissection protocol and sample preparation	162

3.2. Imaging protocol.....	162
3.3. Products	162
3.4. Results analysis.....	162
4. RHO A, ROCKS I/II AND P-MYPT1	
PROTEIN EXPRESION BY WESTERN BLOTTING	163
4.1. Obtaining cell protocol.....	163
4.2. Experimental protocol and Western Blotting.....	163
4.3. Products	164
4.4. Results analysis.....	164
IV. Results	167
1. VASCULAR REACTIVITY STUDIES	169
1.1 2-APB effect	169
1.2 CPA effect.....	169
1.3 HA effect.....	170
1.4 KBR effect	170
1.5 Nifedipine effect.....	171
1.6 SKF effect.....	171
1.7 Vasodilators possible effects due to gender and patients pathologies	171
2. CONFOCAL MICROSCOPY AND VASCULAR	
REACTIVITY STUDIES	172
2.1 2-APB effect	172

2.2 CPA effect	173
2.3 HA effect	174
2.4 Nifedipine effect	174
3. ELECTRON MICROSCOPY STRUCTURAL STUDY	175
4. RHO A, ROCKS I/II AND P-MYPT1/MYPT1	
PROTEIN EXPRESION BY WESTERN BLOTTING	176
4.1 Rho A, ROCK I and II expression	176
4.1.1 Rho A expression	176
4.1.2 ROCK I and II expression	177
4.2 P-MYPT1/MYPT1 expression	177
4.2.1 PMYPT1/MYPT1 expression through age	177
4.2.3 35 years old PMYPT1/MYPT1 expression	178
4.2.4 52 years old PMYPT1/MYPT1 expression	178
4.2.5 62 years old PMYPT1/MYPT1 expression	179
4.2.6 77 years old PMYPT1/MYPT1 expression	180
4.2.7 85 years old PMYPT1/MYPT1 expression	180
4.2.8 All patients group PMYPT1/MYPT1 expression	181
V. Discussion	183
1. VASCULAR REACTIVITY STUDIES	185
2 y 3. CONFOCAL MICROSCOPY WITH VASCULAR	
REACTIVITY STUDY. AND ELECTRON	
MICROSCOPY STUDY.....	186

4. RHO A, ROCKS I/II AND P-MYPT1/MYPT1PROTEIN EXPRESION BY WESTERN BLOTTING	188
V. Discussion.....	183
VI. Conclusions	191
VII. Bibliografía/References	195

I. Introducción

1. ARTERIAS

1.1 Procedencia de las arterias

En este estudio se han utilizado diversas arterias humanas. La arteria mesentérica superior, que es la arteria más importante del aparato digestivo, proveniente de la aorta, riega todo el intestino delgado, el colon ascendente y transverso. La mesentérica inferior que también es una rama colateral de la arteria aorta abdominal y que se ocupa de irrigar una porción del colon transverso, el colon descendente, el colon sigmoide, el recto y la porción superior del ano. Y la arteria apendicular que es rama de la ileobicecoapendicular, última rama derecha de la mesentérica superior y que irriga los 2/3 distales del apéndice (Sinnatamby, 2003).

Las arterias se subdividen generalmente en dos categorías, elásticas y musculares. Las de diámetros grandes, que poseen en la capa media, células musculares lisas y lámina elástica, son las elásticas. Las que decrecen en diámetro a medida que se acercan a la periferia y en las que la media es menos elástica y prevalecen las células musculares, se denominan arterias musculares (Rhodin, 1980)

1.2 Estructura arterial

La pared arterial consta de tres capas, una interna o íntima, una central o media y una capa más externa denominada adventicia, figura 1.

1.2.1 Íntima

Es la capa situada en la luz del vaso. La íntima está compuesta por, una monocapa de células endoteliales, una lámina basal muy fina de alrededor de 80nm y una capa subendotelial compuesta de paquetes de colágeno, fibras elásticas, células lisas musculares y quizás algunos fibroblastos (aunque esta capa sólo suele encontrarse en arterias elásticas). El endotelio está formado por una monocapa de células escamosas que constituye una barrera selectiva frente

a lípidos y lipoproteínas plasmáticas. Las células endoteliales son planas y elongadas, con su eje paralelo al del vaso. Tienen un grosor de entre 0,2-0,5 μ m, excepto en el área del núcleo donde presentan una protuberancia (Rhodin, 1980). Estas células liberan numerosos compuestos vasodilatadores como son: óxido nítrico (NO) (Ignarro et al., 1987), la prostaglandina I₂ (PGI₂) o prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) (Chauhan et al., 2003; Ruiz y Tejerina, 1998). El endotelio también libera sustancias vasoconstrictoras, como el factor contracturante derivado de endotelio, anión superóxido (O₂⁻), tromboxano A₂ (TXA₂) y la endotelina-1 (ET-1), si bien, esta última puede comportarse también como vasodilatadora.

1.2.2 Media

La túnica media es, como su propio nombre indica, la capa intermedia de la pared vascular. Está formada por células musculares, una lámina elástica interna que la separa de la túnica íntima y una externa que la separa de la adventicia, con la posibilidad de aparición de otras láminas intermedias en las arterias de mayor calibre, pero que gradualmente desaparecen según el diámetro de las arterias decrece hacia la periferia, llegando incluso en el caso de arterias pequeñas de resistencia, a desaparecer la elástica externa. Estas láminas elásticas tienen como media de grosor unas 3 μ m y son fenestradas, permitiendo los procesos metabólicos y de difusión. Además, la túnica media está formada por fibras de colágeno y una red de fibras elásticas (Rhodin, 1980).

Las células musculares lisas vasculares (CMLV) son pequeñas (2-10 μ m de diámetro y de 20-600 μ m de longitud), y mononucleadas, que adoptan forma fusiforme irregular y se organizan en láminas o haces de fibras situándose en capas de manera concéntrica. Las CMLV poseen además uniones en hendidura (*gap junctions*) que están atravesadas por orificios de naturaleza proteica que permiten el flujo de iones y otras moléculas, constituyendo una vía de baja resistencia eléctrica que permite el paso de potencial de una a otra (Costa, 1995; Rhodin, 1980). En los vasos más grandes pueden llegar a haber de 25 a 35 capas. Las células se encuentran rodeadas de fibrillas de colágeno. Dependiendo de la posición de la capa donde se encuentre la célula, y del estado funcional del vaso, las CMLV que se sitúan en forma de hélice orientadas

transversalmente a lo largo del eje del vaso, pueden cambiar considerablemente su ángulo y dirección, pudiendo pasar de una posición longitudinal a diagonal, perpendicular o llegar a formar un anillo (Rhodin, 1980). Las CMLV se caracterizan por su diversidad y plasticidad fenotípica. La activación de los mecanismos de control de la contracción muestran una diversidad similar en su sistema de señalización que se adapta al control de la función particular de cada tipo de CMLV (Berridge, 2008), como veremos más adelante.

Esta capa, por lo tanto, es responsable de mantener el tono vasomotor, y se encuentra modulada por los factores liberados desde el endotelio y la adventicia (González et al., 2001).

1.2.3 Adventicia

La túnica adventicia es la capa externa de la pared vascular. Su grosor varía considerablemente dependiendo del tipo y localización del vaso, es más ancha en arterias musculares llegando incluso a ocupar la mitad de la pared vascular. Esta capa es muy compleja, esta formada por tejido fibroelástico denso, sin células musculares lisas, rodeado de tejido conectivo con fibroblastos y macrófagos tisulares (Gutterman, 1999), con fibras terminales nerviosas que son parte de los troncos nerviosos periféricos de órganos sensoriales, músculos y órganos viscerales, aunque otros son nervios vasomotores y sensoriales de la propia pared vascular. Además, por ella pasa el *vasa vasorum* formado por arteriolas, vénulas, pequeños capilares sanguíneos y vasos linfáticos (Cabrera Fischer, 2008; Rhodin, 1980).

La adventicia concede a la pared vascular estabilidad, y sirve para conectar el vaso con los tejidos circundantes además de transportar nutrientes a las CMLV de la capa media e inervar el vaso (González et al., 2001; Rhodin, 1980). Aunque también se han observado evidencias de una posible importante regulación de la función vascular por parte de la adventicia en algunas circunstancias (Cabrera Fischer, 2008; Gutterman, 1999).

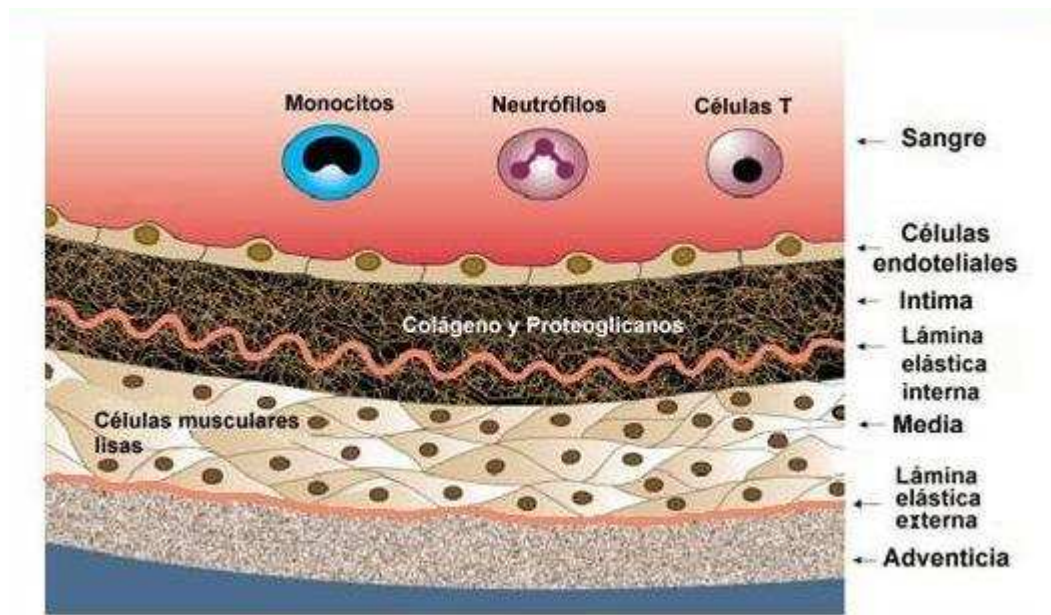
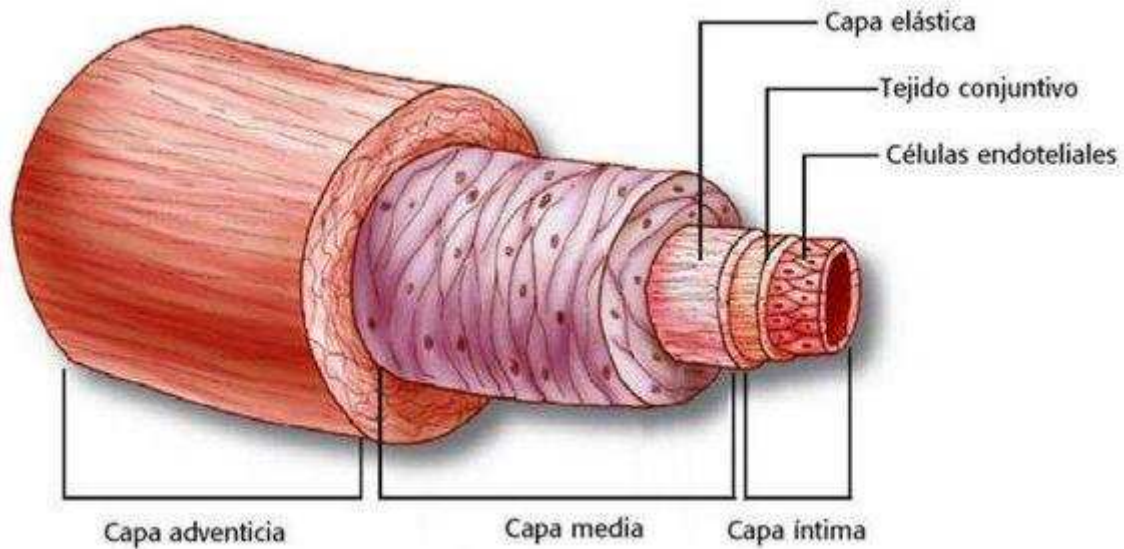


Figura 1: esquema de las capas de la pared arterial, y corte de pared arterial modificado de Lusic, 2000.

2. CALCIO

El calcio se encuentra en el organismo en forma de catión divalente Ca^{2+} . Es un electrolito del plasma, donde se encuentra en concentraciones de 5 meq/L, frente a 1 meq/L de concentración intracelular, por lo que es un electrolito extracelular. Teniendo en cuenta que un requisito indispensable para que una

sustancia actúe como segundo mensajero, es la de su unión a proteínas intracelulares específicas muy especializadas que sean capaces de regular o modular su señal. El Ca^{2+} posee la capacidad de unirse hasta con 8 moléculas de agua, que implica una amplia cantidad de enlaces, en el sitio activo, a los átomos donadores de la proteína, y una gran estabilidad termodinámica, lo que le confiere su función como segundo mensajero. Además de esta función, el calcio tiene otro papel a nivel de las señales de primeros mensajeros, ya que interviene en la liberación de ellos a través de señales intracelulares de cascadas de quinasas y favorece la unión del neurotransmisor al receptor. El ión Ca^{2+} es el segundo mensajero más estudiado, ya que es el que produce mayor número de señales intracelulares, con implicaciones fisiológicas y patológicas (Doadrio Villarejo, 2009).

El Ca^{2+} es esencial en la regulación de un gran número de funciones intracelulares que incluyen la proliferación y diferenciación celular, transcripción, guía axonal y migración celular, contracción, secreción neuroenzimática y exocitosis, desarrollo y mantenimiento de los circuitos neuronales, respuesta inmune, y muerte celular entre otras (Berridge, 2009; Karlstad et al., 2012; Puzianowska-Kuznicka y Kuznicki, 2009), además de estar implicado en la comunicación entre células (Schwaller, 2012). Para conseguir tal versatilidad de funciones, el sistema de señalización de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) opera de forma distinta en un espectro espaciotemporal muy amplio, permitiendo regular los procesos celulares que actúan en un amplio rango dinámico (Berridge et al., 2003; McCarron et al., 2006; Skupin y Thurley, 2012), figura 2. Por ejemplo, en las uniones sinápticas, el Ca^{2+} activa la exocitosis en microsegundos, mientras que en el otro extremo de la escala, tarda de minutos a horas en activar eventos como la transcripción de genes y la proliferación celular (Berridge et al., 2003).

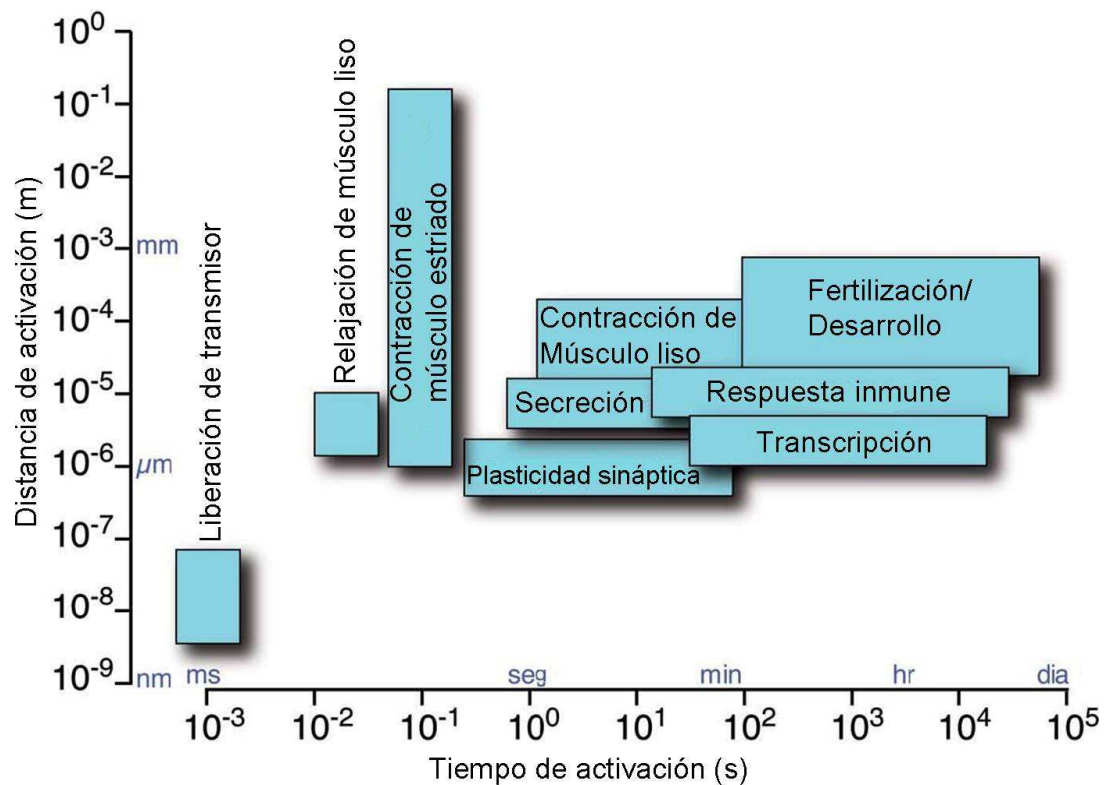


Figura 2: funciones celulares activadas por calcio según tiempo y distancia, modificado de lino 2010.

Puesto que el Ca^{2+} regula tantos procesos fundamentales, un gran número de canales y transportadores se verán involucrados en la regulación de entrada y salida del Ca^{2+} a través de la membrana plasmática (Berridge et al., 2003; Karlstad et al., 2012), como veremos más adelante.

2.1 Homeostasis del calcio

La homeostasis se define como la propiedad de un sistema para regularse en una forma en la que haga que se mantenga estable, es decir, en condiciones constantes, por ejemplo, mantener tantos parámetros como se pueda en un rango fisiológico (Schwaller, 2012). La regulación del metabolismo del Ca^{2+} es vital para las CMLV, con el objetivo de mantener el gradiente de Ca^{2+} entre el espacio extracelular (niveles de Ca^{2+} ionizado en suero) y el Ca^{2+} citosólico libre (Marin et al., 1999). De éste modo, en las CMLV, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantiene extremadamente baja en condiciones basales, alrededor de 100nM, unas 10000

veces menos que la $[Ca^{2+}]$ en el espacio extracelular, que es de aproximadamente de 2mM (Iino, 2010; Marin et al., 1999; McCarron et al., 2006; Orallo, 1996).

El potencial de membrana en reposo de las CML vasculares, determinadas por técnicas electrofisiológicas se encuentra en el rango de -45 a -70 mV, pero a pesar de que tanto el gradiente eléctrico como el de concentración son favorables, la tasa de entrada de Ca^{2+} al interior celular es muy baja por dos razones, la primera es, que los canales de Ca^{2+} de membrana excitables se encuentran cerrados en estado de reposo, y la segunda, que la difusión pasiva de Ca^{2+} a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática es insignificante debido a la alta solubilidad de Ca^{2+} en agua (Orallo, 1996). Aún así, incluso en estado de reposo, la membrana de las CMLV no es completamente impermeable al paso de iones, y pequeñas cantidades de Ca^{2+} son capaces de pasar mediante gradiente electroquímico al interior celular y circular a través de las organelas intracelulares. Las rutas de entrada pasiva parecen ser distintas de las de entrada de Ca^{2+} tras estimulación, puesto que su función es mantener bajas $[Ca^{2+}]_i$ que es esencial para la homeostasis (Lee et al., 2002a; Orallo, 1996). La tasa basal de entrada de Ca^{2+} al músculo liso se ha estimado de 32 moles por litro por minuto, equivalente a 300 veces la $[Ca^{2+}]_i$ en estado de reposo por minuto, con lo que parte de esta entrada se atribuye a una posible apertura de canales excitables debido al potencial de membrana en reposo que permitiría un cierto nivel de apertura de éstos. Adicionalmente, una entrada de Ca^{2+} no específica denominada *goteo de Ca^{2+}* contribuiría sustancialmente a esta entrada en reposo (Lee et al., 2002a).

La activación de la maquinaria contráctil de las CMLV requiere que la $[Ca^{2+}]_i$ exceda 1 μ M (Marin et al., 1999; Orallo, 1996). Puesto que las células y sus correspondientes respuestas son sensibles a variaciones de Ca^{2+} , existen ciertos mecanismos homeostáticos que regulan la $[Ca^{2+}]_i$ y la mantienen por debajo de niveles críticos excepto para producir respuestas celulares (Clapham, 2007; Karlstad et al., 2012; Lee et al., 2002a; Marin et al., 1999; Orallo, 1996). Estos mecanismos son, figura 3:

- Entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales.
- Intercambio de iones a través de la membrana plasmática.
- Transporte activo al espacio extracelular.
- Transporte al interior mitocondrial y nuclear.
- Transporte activo al interior del retículo sarcoplásmico (RS) y proteínas de unión a Ca^{2+} .

2.1.1 Entrada de calcio extracelular a través de canales

Se han observado varias vías de entrada de Ca^{2+} a las células a través de canales de Ca^{2+} activados por voltaje (*voltage operated calcium channels* VOCC), por canales de calcio activados por receptor (*receptor operated calcium channels* ROCC) (Marin et al., 1999), o por almacenamiento (*store operated calcium channels* SOCC) (Gibson et al., 1998; Xu y Beech, 2001).

Dentro de los VOCC tenemos los subtipos: L-, N-, P-, Q-, R- y T-, aunque en músculo liso sólo los tipo L- se consideran la mayor vía de entrada de Ca^{2+} (Ganitkevich e Isenberg, 1991; Karaki et al., 1997; Orallo, 1996). El canal se encuentra situado atravesando la membrana plasmática y funciona utilizando el gradiente electroquímico que se forma por separación de cargas entre los espacios intra y extracelulares polarizando la célula (Karlstad et al., 2012). Este canal puede ser activado por despolarización de membrana mediada por agonistas, a través de la activación de canales catiónicos no selectivos, inhibición de canales de potasio, estiramiento de tejido vascular, y/o activación de canales de cloro activados por Ca^{2+} proveniente del RS (Karaki et al., 1997; Pacaud et al., 1991). Además, puede darse apertura directa o indirecta mediante proteínas de unión a GTP en ausencia de despolarización de membrana (Karaki et al., 1997). Los VOCC son las proteínas de señalización de Ca^{2+} más rápidas y conducen alrededor de un millón de iones de Ca^{2+} por segundo (Clapham, 2007), cuando se activan, permiten el paso de Ca^{2+} extracelular al interior del citosol, que contribuye parcialmente al inicio del desarrollo de la fuerza de contracción y causa la liberación de Ca^{2+} desde orgánulos de almacenamiento intracelular en un proceso denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Crowley et al., 2002; Hall et al., 2006; Orallo, 1996), e incluso podría formar parte fundamental del proceso de relleno de esos orgánulos (Kuo et al., 2003).

Durante una despolarización sostenida con entrada de Ca^{2+} a través de VOCC, éstos sufren una desensibilización debido a la alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$, según un proceso de retroalimentación negativo (Ganitkevich e Isenberg, 1991; Karaki et al., 1997; Orallo, 1996). Además, estos canales pueden ser bloqueados por varios compuestos como son las dihidropiridinas (Long et al., 1999). Así, preincubaciones con nifedipina $5\mu\text{M}$ redujeron la fuerza generada por fenilefrina (phe) $50\mu\text{M}$ en vena safena humana alrededor de un 40% (Crowley et al., 2002), de forma similar a lo obtenido por Dai y colaboradores en 2007 en músculo liso de bronquios humanos, que redujeron con nifedipina $10\mu\text{M}$ un 35% una precontracción de acetilcolina $3\mu\text{M}$, además de atenuar la frecuencia de las oscilaciones asincrónicas de Ca^{2+} , aunque no abolirlas. Mientras que en datos previos de nuestro laboratorio observamos que en arteria mesentérica de ratón la nifedipina $10\mu\text{M}$ redujo la precontracción con fenilefrina $5\mu\text{M}$ en un 90% (Dai et al., 2010) y en aorta de ratón la reducción fue de un 50% (Esfandiarei et al., 2010).

Como hemos descrito anteriormente, presentes en músculo liso aparecen varios tipos de canales plasmáticos permeables a Ca^{2+} que no son voltaje dependientes, donde se incluyen a los ROCC, activados por agonistas que actúan en un rango de proteínas G acopladas a receptor y SOCC, que se activan al detectarse el vaciado del RS (McFadzean y Gibson, 2002). Aunque la identidad molecular de varios tipos de ROCC y SOCC no se conocen en la actualidad, se les relaciona con los canales TRP (Cahalan, 2009; Dai et al., 2007; Lee et al., 2002b). Se ha descrito un gran número de corrientes de ROCC en distintos tipos de CMLV tras la activación de un amplio rango de receptores (McFadzean y Gibson, 2002). Los SOCC también conocidos como canales de entrada de calcio por capacitancia, no se activan por la liberación del Ca^{2+} desde el RS puesto que no son canales operados por calcio, sino que se activan por el hecho de la apertura de los canales del retículo sarcoplásmico (RS) que se ha visto que dependen de un proceso en el que se encuentran involucradas las proteínas STIM1 (molécula de interacción con el estroma) y Orai (Cahalan, 2009; Karlstad et al., 2012). Estos canales forman parte, por lo tanto, del proceso de entrada de Ca^{2+} operado por liberación de Ca^{2+} del RS, también llamada entrada de calcio por capacitancia, que tiene la función de relleno del RS y además determinan el estado contráctil de algunas células musculares (Berridge, 2009;

Cahalan, 2009; Gibson et al., 1998; Lee et al., 2002b; Leung et al., 2008; Marthan, 2004; McFadzean y Gibson, 2002; Putney et al., 2001; Putney y McKay, 1999; Xu y Beech, 2001).

Tanto los ROCC como los SOCC, pueden ser bloqueados por el 1- β -[3-(4-metoxifenil)propoxy]-4-metoxifenil} -1H- imidazol, SKF-F96365 (SKF) (Crowley et al., 2002; McFadzean y Gibson, 2002; Merritt et al., 1990), aunque este fármaco dista de ser específico (Gibson et al., 1998). En el caso de la vena safena humana la preincubación con SKF 50 μ M produjo una disminución de la contracción de phe 50 μ M de alrededor de un 25% (Crowley et al., 2002), mientras que en el músculo anococcigeo de ratón la contracción se abolió completamente con SKF 10 μ M (Gibson et al., 1998) y en arterias mesentéricas de resistencia de rata redujo en un 76% la precontracción con noradrenalina 10 μ M a una concentración de 30 μ M (Lagaud et al., 1999). Aunque habitualmente este fármaco es usado para inhibir la contracción insensible a nifedipina tras el uso de ésta (Dai et al., 2010; Lee et al., 2001) siendo también capaz de inhibir completamente las oscilaciones asincrónicas de Ca^{2+} (Dai et al., 2007).

2.1.2 Intercambio de iones a través de la membrana plasmática

La expulsión de Ca^{2+} citosólico es realizado por las bombas de intercambio sodio/calcio (*sodium calcium exchangers* NCX). Existen dos familias, las de sodio calcio y las de sodio potasio calcio, que presentan una baja afinidad por Ca^{2+} aunque una alta capacidad de transporte de dicho ión. La dirección de transporte de iones por estas bombas depende del potencial de la membrana plasmática, del gradiente de concentración para cada ión transportado y de la estequiometría que generalmente se traduce en un intercambio de 3 iones sodio (Na^+) al interior celular por uno de Ca^{2+} al exterior, y 4 de Na^+ al interior, por uno de Ca^{2+} y otro de potasio (K^+) al exterior, respectivamente (Gómez-Villafuertes et al., 2007; Karlstad et al., 2012; Marin et al., 1999; Orallo, 1996). En condiciones fisiológicas, el potencial de membrana es más negativo que el potencial de modo reverso de las bombas, con lo que operan en modo normal (extrayendo Ca^{2+} de la célula), pero las bombas pueden funcionar en modo reverso e introducir Ca^{2+} extracelular cuando su potencial de equilibrio baja por debajo del de la membrana plasmática (Gómez-Villafuertes et al., 2007) debido a cambios en la

$[Na^+/Ca^{2+}]_i$, aunque para ello se precisa una $[Na^+]_i$ de 10-20mM mayor a la que se encuentra en el citosol (Fameli et al., 2009). Por lo tanto la principal función de las bombas es la de expulsar el exceso de Ca^{2+} tras la contracción cuando alcanza concentraciones de $1\mu M$. Aunque en el caso de una despolarización de membrana y cambio en la $[Na^+]_i$, el modo reverso de la NCX sería importante en el proceso de entrada de Ca^{2+} extracelular y consecuente relleno del RS (Ashida et al., 1988; Fameli et al., 2007; Karaki et al., 1997; Kuszczak et al., 2010; Lee et al., 2001; Szado et al., 2003; Zhu et al., 1994). Este proceso puede inhibirse por medio del 2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)fenyl]ethyl]isotiourea, KBR-7943 (KBR), inhibidor del modo reverso del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Ladilov et al., 1999). En músculo liso de bronquios humanos, KBR $10\mu M$ redujo en aproximadamente un 78% una precontracción de acetilcolina $3\mu M$ tras aplicación de nifedipina e inhibió las oscilaciones asincrónicas de Ca^{2+} insensibles a nifedipina (Dai et al., 2007), y en vena cava inferior de conejo pretratada con nifedipina, redujo la contracción tónica inducida por phe $5\mu M$ en un 75% además de inhibir las oscilaciones de Ca^{2+} (Lee et al., 2001), mientras que en estudios previos de nuestro laboratorio en arteria mesentérica humana tras precontracción con $5\mu M$ de phe y nifedipina $10\mu M$ no produjo prácticamente relajación (Dai et al., 2010).

2.1.3 Transporte activo al espacio extracelular

El Ca^{2+} es transportado activamente al espacio extracelular por la bomba ATPasa de Ca^{2+} del plasmalema (PMCA), una proteína transmembrana que presenta alta afinidad por Ca^{2+} aunque baja capacidad de transporte. Está considerada electroneutra, es decir, utilizando la hidrólisis de ATP como energía, por cada Ca^{2+} que saca al espacio extracelular, entran dos hidrógenos (H^+) con lo que además tiene un importante papel en la regulación del pH intracelular (Akata, 2007a; Brini y Carafoli, 2009; Marin et al., 1999; Pottorf et al., 2000). Aunque se ha observado que podría ser electrogénica y transportar iones en un intercambio 1:1 (Orallo, 1996). Además este intercambio se encuentra acoplado a una bomba de Na^+ , o una ATPasa de intercambio Na^+/K^+ , manteniendo los gradientes de membrana al introducir $2K^+$ y expulsar $3Na^+$ al espacio extracelular (Akata, 2007a).

Una propiedad importante de la PMCA es la cantidad de mecanismos que la activan. Tanto la unión a Calmodulina, como los ácidos fosfolipídicos que suelen encontrarse en el ambiente que rodea a la bomba, y la fosforilación por proteínas kinasa C y A (Brini y Carafoli, 2009).

2.1.4 Transporte al interior mitocondrial y nuclear

En las CMLV las mitocondrias poseen forma ovalada y una longitud de 1-5 μm (McCarron et al., 2006). La principal vía de transporte de Ca^{2+} al interior mitocondrial es un uniportador electroforético con baja afinidad y alta capacidad por Ca^{2+} , que utiliza el gradiente electronegativo de potencial de la membrana interna de la mitocondria (debido a la extrusión de H^+ mediante la cadena respiratoria) para producir la entrada de Ca^{2+} (Lee et al., 2002a; Marin et al., 1999; McCarron et al., 2006; Orallo, 1996; Sanders, 2001; Somlyo, 1985; Somlyo y Himpens, 1989; Szado et al., 2003; Wray y Burdyga, 2010). La membrana mitocondrial interna, posee también una bomba de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, para eliminar el exceso de Ca^+ en el interior mitocondrial (McCarron et al., 2006; Orallo, 1996). Debido a la baja afinidad del transportador por Ca^{2+} , se pensaba que la mitocondria sólo tenía un papel relevante en la captación de Ca^{2+} en situaciones patológicas de elevada $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Buchholz et al., 1996; Karaki et al., 1997; Marin et al., 1999; Orallo, 1996; Somlyo, 1985), o en situaciones de estrés o células con RS poco desarrollado (Orallo, 1996). Actualmente se ha observado la formación de microdominios de mitocondria con RS y otras estructuras donde hay alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en los que las mitocondrias forman parte importante en la homeostasis, señalización y captación de Ca^{2+} (McCarron et al., 2006; Sward et al., 2002; Szado et al., 2003; Wray y Burdyga, 2010).

El núcleo se encuentra rodeado por el RS formando una red que es contigua a la membrana nuclear (Avedanian et al., 2010; Wray y Burdyga, 2010) donde se han encontrado varios tipos de componentes de señalización como bombas de intercambio y canales iónicos, que se encuentran habitualmente en la membrana plasmática. La concentración de Ca^{2+} intranuclear se ha visto que es distinta de la citosólica, normalmente menor en reposo y mayor cuando hay activación celular (Lee et al., 2002a). El espacio perinuclear podría funcionar como un lugar de almacenamiento de Ca^{2+} al estar situado contiguo al lumen del

RS (Avedanian et al., 2010; Orallo, 1996) y tener algún papel en la homeostasis (Orallo, 1996).

2.1.5 Transporte activo al interior retículo sarcoplásmico y proteínas de unión a calcio

El mecanismo de transporte activo al interior del RS, es una bomba ATPasa de Ca^{2+} (SERCA), que forma parte de la familia de las ATPasas tipo P del subgrupo IIA, y que se caracterizan por una conservación temporal de energía de ATP en forma de enzima fosforilada. Existen 3 isoformas dentro del subgrupo, de ellas, la isoforma 2a se encuentra en muchos tipos de músculo liso, la 2b es ubicua y por tanto también se encuentra en músculo liso (Brini y Carafoli, 2009; Dagnino-Acosta y Guerrero-Hernandez, 2009; Sweadner y Donnet, 2001). La SERCA transporta 2 iones Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada, intercambiándolos al espacio intracelular por menos de 4 H^+ cada vez, con lo que es un mecanismo electrogénico que además puede ser responsable de la alcalinización del lumen del RS. SERCA2b es la única de su familia que posee un carboxilo terminal largo con el que interaccionan distintas proteínas de unión como calreticulina y calnexina que pueden controlar su actividad (Brini y Carafoli, 2009; Gómez-Viquez et al., 2003). Todas las bombas tipo P pueden ser inhibidas reversiblemente por el ácido ciclopiazónico (CPA) que ocupa el canal de acceso del Ca^{2+} en la molécula que forma la bomba. En el caso de la arteria de la cola de rata, la CPA produce aproximadamente un 50% de relajación en la tensión producida por altas concentraciones de potasio junto a noradrenalina $10\mu\text{M}$ (Dreja et al., 2001). En vena cava inferior de conejo indujo un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a la vez que inhibía las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por $5\mu\text{M}$ de phe (Lee et al., 2001).

Todo ello indica que la SERCA2b juega un papel importante en el mantenimiento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en citoplasma y RS (Brini y Carafoli, 2009; Gómez-Viquez et al., 2003).

Existen dos teorías acerca de cómo se regula la homeostasis por parte del RS con ayuda de SERCA y la NCX:

- Barrera superficial de amortiguación: van Breemen y colaboradores en 1995 propusieron esta hipótesis, en la cual, el RS (del que hablaremos más detalladamente en el punto 2.2) tiene un papel fundamental. En base a la morfología y posicionamiento del RS, proponen definir el espacio citoplasmático en al menos tres regiones de muy distinto volumen: un espacio interunión, definido como un espacio muy estrecho entre las zonas de unión de las membranas del RS y membrana plasmática que contiene una alta $[Ca^{2+}]$; un espacio restringido, el subplasmalema, definido como el espacio discontinuo entre las anteriores membranas en las zonas anchas donde no hay uniones; por último, el espacio mioplásmico profundo, que se encuentra por debajo del RS superficial y constituye la mayor parte del citoplasma. Y, según esta división, el modelo presenta las siguientes características:

- (1) Una fracción variable de Ca^{2+} que penetra al interior de las CML vasculares es introducida en el RS superficial.
- (2) La entrada de Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática, en combinación con su traspaso desde el subplasmalema hacia el RS mediante SERCA, crea un gradiente en el citoplasma periférico.
- (3) SERCA juega un papel importante en el complejo proceso de extrusión de Ca^{2+} desde la CMLV.
- (4) Los agonistas que son capaces de liberar Ca^{2+} al mioplasma, elevarán la concentración basal de Ca^{2+} mioplásmico pasando por alto la barrera superficial de amortiguación.

Postulan por tanto dos mecanismos hipotéticos de funcionamiento de la barrera. En el primero, la combinación de producción de inositol-(1,4,5)-trifosfato (IP_3) basal y la fosfatasa citoplasmática de IP_3 generaría un gradiente de IP_3 cercano al plasmalema que activaría los receptores de IP_3 y en consecuencia los receptores de rianodina en la región de interunión. La liberación de Ca^{2+} resultante incrementaría la $[Ca^{2+}]$ cercana a la NCX facilitando la extrusión de Ca^{2+} . En este modelo, se separa espacialmente la extrusión de Ca^{2+} desde la región interunión de la amortiguación de Ca^{2+} por captación en el subplasmalema. En el segundo modelo, se separa temporalmente la amortiguación de la extrusión. Para ello una apertura espontánea de los canales

de Ca^{2+} del RS superficial libera Ca^{2+} al espacio interunión. Este aumento temporal de la $[\text{Ca}^{2+}]$ facilita una liberación espontánea de Ca^{2+} mediante la NCX y por tanto una liberación intermitente (van Breemen et al., 1995).

- Trampa de Ca^{2+} (*calcium trap*): está basada en la anterior hipótesis, pero con la diferencia de que afirman que únicamente con el trabajo de las bombas de extrusión y entrada de Ca^{2+} al RS el sistema no podría mantener la homeostasis. Esta hipótesis se basa, por tanto, en que en las regiones en las que el RS se sitúa casi pegado a la membrana plasmática, la membrana plasmática y el RS podrían formar una barrera física pasiva a la entrada de Ca^{2+} para restringir el movimiento libre del ión, y así limitar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citoplasma ralentizando la tasa de Ca^{2+} que llega al citoplasma interno. El Ca^{2+} que queda atrapado en esta zona interunión, podría ayudar al relleno del RS, lo que limitaría el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citoplasma (Bradley et al., 2004; McCarron et al., 2004; McCarron et al., 2006).

Las proteínas de unión a Ca^{2+} (*calcium binding proteins*, CBP) tienen la habilidad de unir este ión a zonas específicas de sus moléculas de forma selectiva y reversible con una cinética muy rápida (Yáñez et al., 2012). Pero para ello dependen de varios factores: las propiedades de unión a Ca^{2+} del amortiguador, como puede ser la afinidad por Ca^{2+} y otros iones y la cinética de unión/liberación de Ca^{2+} , la concentración intracelular del amortiguador de Ca^{2+} , y la movilidad del amortiguador de Ca^{2+} en el citosol (Schwaller, 2012). Existen varias CBP, entre ellas a calmodulina (CaM) es una de los más veloces amortiguadores, con 4 zonas de unión a Ca^{2+} por molécula, de las que sólo son ocupadas dos cuando se produce entrada de Ca^{2+} extracelular, a la espera de ocupar 3 ó 4 sitios de unión para que se produzca el cambio conformacional y el proceso contráctil (Orallo, 1996). Las interacciones proteicas que dependen de Ca^{2+} en proporciones submicromolares, frecuentemente, son mediadas por calmodulina. Existen otras CBP como la familia de las S100, o la calcineurina, además de las proteínas que poseen el dominio C2 como la proteína kinasa C (PKC) activada por Ca^{2+} y diacilglicerol (DAG). Se pueden encontrar otras CBP en el interior del RS, como la calreticulina, calnexina y otras. La calreticulina es la más importante, posee un sitio de unión de Ca^{2+} de baja afinidad y alta

capacidad, y otro con alta afinidad y baja capacidad de unión, que le confieren la capacidad de regular la captación y liberación de Ca^{2+} del RS y mitocondria, y una alta expresión de esta CBP, está relacionada directamente con un aumento significativo de la capacidad del RS de retener Ca^{2+} (Yáñez et al., 2012). Se ha estimado que más del 50% del Ca^{2+} que se encuentra en el RS, está unido a calreticulina (Wray y Burdyga, 2010).

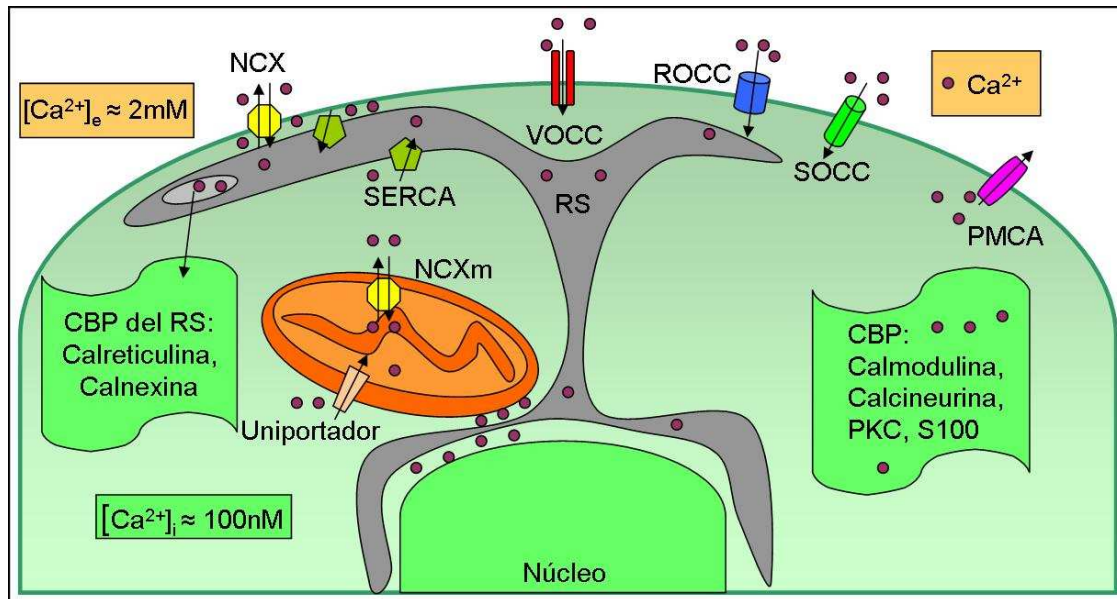


Figura 3: mecanismos de mantenimiento de la homeostasis.

2.2 Retículo sarcoplásmico

En 1967 Hurwitz y colaboradores postularon la presencia de un orgánulo de almacenamiento de Ca^{2+} en CMLV, al observar Ca^{2+} en el interior celular, tras introducir las células en medio libre de Ca^{2+} . Posteriormente, comprobaron que respuestas contráctiles, supuestamente dependientes de Ca^{2+} , podían continuar produciéndose durante un tiempo variable, en medios libres de dicho ión. Más adelante mediante microscopía electrónica (EM), se observó un sistema membranoso de túbulos y sacos que se encontraban cerca de la periferia celular y de las caveolas, a la vez que se podía observar en la zona interna de la célula. Además se comprobó que dicho sistema se encontraba cercano a mitocondrias y núcleo. Sugiriéndose que el RS podría ser el mayor reservorio intracelular de Ca^{2+} (Gabella, 1971). El RS ocupa en músculo liso de conejo un 5% del volumen

celular en aorta y arteria pulmonar, y alrededor de un 2% en arteria y vena mesentérica (Devine et al., 1972), y se describe como periférico o superficial cuando se encuentra cercano a la membrana plasmática y rodeando las caveolas, aunque sin tocarlas, o central, también denominado profundo cuando esta separado de la membrana (Wray y Burdyga, 2010).

2.2.1 Canales de liberación y bombas de internalización de calcio

La liberación de Ca^{2+} desde el RS en CMLV se produce por medio de la activación de dos familias de canales de liberación de Ca^{2+} , los canales de rianodina (RyR) y los de inositol trifosfato (IP_3), que poseen bastantes similitudes estructurales (Wray y Burdyga, 2010).

2.2.1.1 Canales de rianodina

El receptor de rianodina (RyR) es un homotetrámero con las subunidades rodeando el poro central de Ca^{2+} . Debido a la región corta y ancha del canal, el RyR puede realizar liberaciones de Ca^{2+} repentinas y de larga duración desde el RS. Existen 3 isoformas del receptor, RyR1 y 2 que se expresan predominantemente en músculo esquelético y cardíaco respectivamente, y la RyR 3 que se expresa en diversos tejidos. Todas las isoformas pueden expresarse en músculo liso, con el tipo y la proporción de expresión de cada uno, dependiente del tejido y la especie (Neylon et al., 1995). RyR2 parece ser el componente más importante en la formación de chispas de Ca^{2+} (*calcium sparks*) en músculo liso. El canal se activa en respuesta a rianodina, Ca^{2+} y a cafeína, que se utiliza como inductor de liberación de Ca^{2+} desde RS (Saida, 1982), puesto que incrementa la sensibilidad de RyR a Ca^{2+} mediante el incremento de la probabilidad de apertura del canal sin cambiar su conductancia. Realiza este proceso de liberación en dos fases, una pequeña liberación inicial y luego un proceso regenerativo, en el que el Ca^{2+} liberado, actúa sobre un grupo de RyR, produciendo más liberación de Ca^{2+} . La rianodina se utiliza en bajas concentraciones para vaciar el RS al provocar que los canales de rianodina se mantengan en un estado de semiconductancia lo que produce la imposibilidad de relleno del RS, pérdida de chispas de calcio y la habilidad de producir

ondas y oscilaciones. La rianodina es también en altas concentraciones el inhibidor más utilizado y por la cual los RYR adquirieron su nombre debido a su extremadamente alta afinidad por ella (Wray y Burdyga, 2010).

2.2.1.2 Canales activados por inositol trifosfato

La unión de un agonista al receptor acoplado a proteína G en músculo liso, lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC) específica de fosfatidilinositol, que cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) en inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) (Berridge y Galione, 1988). El IP_3 libera Ca^{2+} desde el RS al unirse a receptores de IP_3 , que son canales de calcio activados por IP_3 (IP_3R), y el DAG activa a la PKC. Los IP_3R se expresan extensivamente en músculo liso, de hecho, en mayor cantidad que los RYR, con un ratio estequiométrico de 3-4 a 1. La musculatura lisa vascular espera múltiples isoformas de IP_3R , aunque el nivel de expresión de los distintos subtipos es tejido y especie dependientes. En la aorta torácica y arterias mesentéricas, la única isoforma encontrada es la IP_3R1 . En algunos tipos de músculo liso se han podido observar IP_3R1 en toda la célula, RS central y periférico (Nixon et al., 1994), en otros sólo se han encontrado en una localización más periférica. También se han observado en la membrana nuclear. La actividad de IP_3R no sólo depende de la concentración de IP_3 , sino también de la $[Ca^{2+}]$ en el citosol. Esto permite que la liberación de Ca^{2+} mediante este proceso, regule próximas liberaciones. La actividad de IP_3R1 puede ser estimulada a $[Ca^{2+}]$ menores de 300nM mientras que a mayores se inhibe el mecanismo de liberación (Iino, 2010). La sensibilidad de los IP_3R se regula también por los niveles de Ca^{2+} en el lumen del RS, dado que un bajo contenido reduce la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 . El inhibidor usado más comúnmente es el 2-aminoetoxidifenilborato (2-APB) que inhibe la apertura de IP_3R sin afectar a la unión o síntesis de IP_3 (Wray y Burdyga, 2010). Así, en arterias mesentéricas pequeñas de rata, tras precontracción con phe 10 μ M, 30 μ M de 2-APB casi inhibió completamente la contracción y totalmente las ondas asincrónicas de Ca^{2+} (Lamont y Wier, 2004). Por otro lado en vena cava inferior de conejo el pretratamiento con 2-APB 75 μ M inhibió una posterior contracción con phe 5 μ M (Lee et al., 2001) al igual que en arteria mesentérica humana (Dai et al., 2010). Además de que impidió el inicio

de oscilaciones de Ca^{2+} y las inhibió una vez inducidas por phe 5 μM en vena cava de conejo (Lee et al., 2002b).

2.2.1.3 Bombas de internalización de calcio

La bomba encargada de la captación e internalización de calcio al RS es la ATPasa de calcio del RS o SERCA, que y ha sido descrita en el punto 2.1.5.

2.2.2 Mecanismos de liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico

Como se ha visto anteriormente, existen dos tipos de canales por los que se puede liberar Ca^{2+} desde el RS en músculo liso. Los RYR que son sensibles a rianodina, cafeína y Ca^{2+} , y los IP_3R sensibles a IP_3 . De la presencia de dos tipos de canales para regular la liberación de Ca^{2+} desde el RS se llegó a una clasificación donde dependiendo del tipo de músculo liso y de la especie, los RS podían ser un solo orgánulo con los dos tipos de receptor (S_α), un orgánulo con IP_3R (S_β), o con RYR (S_γ), o dos orgánulos con los dos receptores distintos, aunque esta última teoría está siendo puesta en duda (Wibo y Godfraind, 1994; Wray y Burdyga, 2010).

La liberación de Ca^{2+} intracelular no requiere de entrada de Ca^{2+} extracelular, y puede ser activada por acoplamiento farmacomecánico, que es un proceso independiente de cambios en el potencial de membrana (Somlyo, 1985). Originariamente se relacionaba el proceso denominado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (*calcium induced calcium release*, CICR) con los canales de rianodina, de hecho, las respuestas contráctiles inducidas por rianodina producidas en algunos músculos lisos son producidas en gran parte por liberación de Ca^{2+} desde el RS que causa la entrada de Ca^{2+} extracelular y el consecuente relleno del RS. Aunque se ha visto que los canales de IP_3 también se regulan por este método (Marin et al., 1999), mientras que en este caso se le denomina liberación de calcio inducida por IP_3 (IICR) (Akata, 2007a; Orallo, 1996). En este caso, se ha observado que los canales IP_3R son capaces de liberar una amplia cantidad de Ca^{2+} al citosol con una variable conductancia de 8-26pS y una media de apertura de 10mseg (Orallo, 1996), lo que les confiere un rol fisiológico primario en la movilización de Ca^{2+} mediante IICR. Este proceso

es bifásico, con una liberación rápida, seguida de una lenta denominada liberación cuantal de Ca^{2+} (Akata, 2007a). La función fisiológica de CICR no está clara, aunque se han propuesto varias funciones potenciales: amplificación de la señal de Ca^{2+} inducida por agonistas, la creación de oscilaciones de Ca^{2+} , la iniciación de ondas de Ca^{2+} y una posible función importante en el mecanismo de barrera superficial de amortiguación (Akata, 2007a; Marin et al., 1999).

2.2.3 Señales elementales de calcio desde el retículo sarcoplásmico

Muchos de los componentes de señalización de Ca^{2+} se encuentran organizados en complejos macromoleculares con funciones y localizaciones específicas. Estos complejos pueden funcionar como unidades autónomas o módulos que se pueden mezclar y multiplicar para crear sistemas de señalización más grandes y diversos (Berridge et al., 2003). Las señales de Ca^{2+} que producen oscilaciones de Ca^{2+} , al aumentar su frecuencia, a veces se dispersan a través del citoplasma en forma de ondas regenerativas de cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]$ (Clapham, 2007), y dependen en rondas sucesivas de liberación y difusión de Ca^{2+} desde agrupaciones de IP_3R o R_2YR que se localizan en la membrana del RS. En el caso de los IP_3R , las agrupaciones producen señales locales denominadas puffs, mientras que las agrupaciones de R_2YR emiten chispas de Ca^{2+} (Berridge et al., 2003). Normalmente, estas señales elementales de Ca^{2+} se elevan desde zonas restringidas espacialmente donde se encuentran formando agrupaciones de 15-30 IP_3R y donde producen una modesta elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica (~25-170 μM), llegando a su pico máximo en ~50mseg, y decayendo en ~300mseg. La difusión espacial es muy limitada (~2-6 μm), y en estas zonas limitantes la $[\text{Ca}^{2+}]$ disminuye ampliamente (~50-600 nM). Aunque los IP_3R se activan por medio de IP_3 , los puffs de Ca^{2+} se regeneran de diversas maneras por un proceso de CICR. Si el proceso es dependiente de IP_3 , puede ocurrir que la liberación de Ca^{2+} desde estos agrupamientos durante un puff tenga una corta duración y no pueda pasar a otros agrupamientos, pero el canal IP_3R se readapte rápidamente y pueda ser reactivado por un incremento en la $[\text{IP}_3]$, puesto que a altas $[\text{IP}_3]$ podrían interactuar con otras agrupaciones y formar oscilaciones. El proceso, sin embargo, podría no implicar IP_3 en su regeneración y sí, producirse por medio de canales R_2YR , puesto que una vez se libera Ca^{2+}

por medio de IP_3 desde el RS, se activa la apertura de los canales RYR y se continúa la propagación de la oscilación gracias a estos canales y sin mediar más canales IP_3R (Berridge et al., 2003; McCarron et al., 2006). Este mecanismo saltatorio de propagación permite a la señal producir oscilaciones y ondas que pueden llegar a pasar de célula a célula e incluso entre tipos celulares distintos como células musculares y endoteliales.

Las chispas de Ca^{2+} en músculo liso pueden ocurrir espontáneamente o tras la activación de uno de los siguientes factores: bajas concentraciones de cafeína (1mM), elevación global de la $[Ca^{2+}]_i$ por entrada de calcio a través de VOCC, incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en el RS y por estiramiento (Wray y Burdyga, 2010). Teóricamente, la formación de chispas de Ca^{2+} es un proceso de reacción de difusión en la que la liberación de Ca^{2+} desde un espacio delimitado, difunde al citosol y es recaptado por varios amortiguadores y mecanismos de transporte (Cheng y Lederer, 2008). Aunque las chispas de Ca^{2+} no suelen ser propagables, algunas activan ondas de propagación de aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ intracelular cuando aumenta la $[Ca^{2+}]_i$ en el RS.

Las señales de Ca^{2+} tienden a prolongarse en el tiempo y como resultado la señal se transforma en una onda de Ca^{2+} para alcanzar objetivos distribuidos a lo largo de la célula. Durante esta estimulación prolongada, las señales se repiten para establecer oscilaciones regulares de Ca^{2+} que se han implicado en el control de distintos procesos (Berridge et al., 2003).

Las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por agonistas, forman el mecanismo de señalización intracelular de las células excitables como las CMLV. Aunque todas dependen de las interacciones entre membrana plasmática y RS, existen dos tipos distintos de oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ (Lee et al., 2002a). Las asincrónicas descritas por primera vez por lino y colaboradores en 1994, que se producen por niveles bajos de estimulación adrenérgica, y que se propagan desde un punto de origen para luego llenar la célula. Y las sincrónicas, que son uniformes y aparecen con altos niveles de estimulación adrenérgica, continuando durante largos periodos y produciendo vasomoción (Mauban et al., 2001), que podría venir iniciada por oscilaciones asincrónicas. La vasomoción se asocia a oscilaciones lentas del potencial de membrana y de la $[Ca^{2+}]_i$. La función del RS es muy importante para la activación de las oscilaciones y los canales de K^+ juegan un papel modulador. En varios tejidos que presentan oscilaciones

sincronizadas, son las células marcapasos las que las producen, pero no parecen existir en la pared vascular, con lo que otro mecanismo debe de estar implicado (Peng et al., 2001). Este mecanismo oscilatorio de relleno de Ca^{2+} es el que forma las bases del modelo del oscilador citosólico, que se basa en la secuencia de los siguientes eventos, figura 4:

- (1) El inicio y/o modulación depende de la acción de agonistas que aumentan la formación de IP_3 y DAG.
- (2) El oscilador es dependiente de la entrada de Ca^{2+} para el relleno del RS para cada ciclo de oscilación. Esto puede darse por medio de diversos mecanismos como entrada de Ca^{2+} mediante el modo reverso de la bomba NCX (Dai et al., 2010; Lee et al., 2001), la entrada por VOCC agrupados e incluso entrada por algunos canales TRP (*transient receptor channels*), (Peppiatt-Wildman et al., 2007).
- (3) La entrada de Ca^{2+} extracelular para rellenar el RS y sensibilizar los RYR e IP_3R previo a la siguiente fase de vaciado.
- (4) El mecanismo responsable del inicio de la liberación de Ca^{2+} desde RS puede depender de RYR o IP_3R , como hemos visto anteriormente.
- (5) Esta liberación inicial es ampliada mediante liberación regenerativa de Ca^{2+} desde el RS, mediado por RYR o IP_3R dependiendo del tipo celular.
- (6) La señal global de Ca^{2+} activa la contracción.
- (7) La fase de recuperación depende de la SERCA que recapta el Ca^{2+} liberado y rellena el RS, a su vez, la PMCA lo expulsa al exterior celular.
- (8) Uno de los efectos del Ca^{2+} liberado en forma de chispas desde RYR, es la estimulación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} que hiperpolarizarán la membrana.
- (9) Otro de los efectos del Ca^{2+} liberado es la estimulación de los canales de Cloro activados por Ca^{2+} , que despolarizan la membrana y activan los VOCC introduciéndose Ca^{2+} extracelular resultando en una mayor despolarización.
- (10) Esta despolarización se puede propagar a células vecinas mediante el flujo de corriente a través de las uniones en hendidura apareciendo la sincronización entre células y por lo tanto la vasomoción (Berridge, 2008).

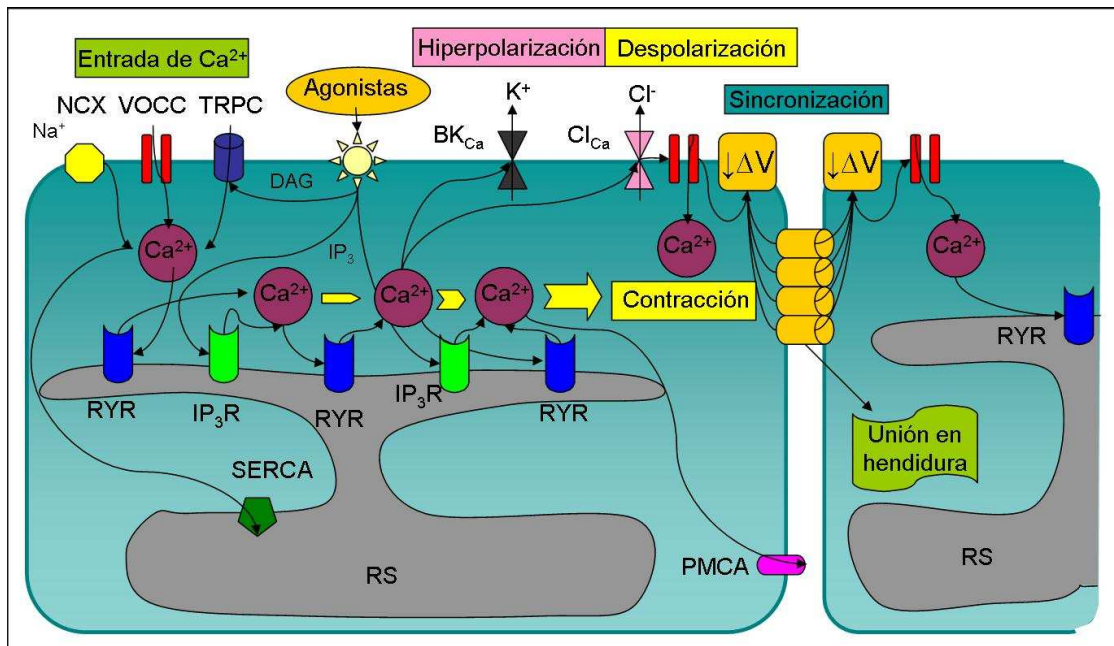


Figura 4: proceso de formación de oscilaciones y sincronización celular.

3. REGULACIÓN DEL TONO DEL MÚSCULO LISO VASCULAR

El aumento y la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$, son los principales mecanismos que provocan la contracción y la relajación del músculo liso vascular y la consecuente regulación del tono vascular.

3.1 Mecanismo de contracción del músculo liso vascular

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es el resultado de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales de la membrana plasmática celular y/o de su liberación desde sus depósitos intracelulares, fundamentalmente del retículo sarcoplásmico (RS). Tras este aumento, el Ca^{2+} se une a los 4 sitios de unión de la calmodulina (CaM) induciendo un cambio conformacional en ésta, formando el complejo Ca^{2+} -calmodulina. En esta conformación se une a la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) formando el complejo activo Ca^{2+} -CaM-MLCK. Una vez activada, la MLCK induce la fosforilación de la serina en posición 19 de la cadena ligera (20 kD) de la miosina (MLC20). Esta fosforilación permite la unión

de la actina y la activación de la ATPasa de la miosina, lo que facilita el establecimiento de los puentes cruzados entre ambas proteínas y el desarrollo de fuerza o acortamiento del músculo liso vascular denominado contracción (Rembold, 1992; Somlyo y Himpens, 1989; Somlyo y Somlyo, 1994).

3.1.1 Acoplamiento excitación-contracción

En condiciones fisiológicas un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ puede dar lugar al acoplamiento excitación-contracción en músculo liso, y esto puede producirse por medio de dos mecanismos. Un cambio en el potencial de membrana o acoplamiento electromecánico, y la unión de un agonista contráctil a un receptor o acoplamiento farmacomecánico (McFadzean y Gibson, 2002; Orallo, 1996). Ambos mecanismos se pueden dar simultáneamente en una célula, actuando individualmente o ambos a la vez. De hecho, ambos mecanismos no son independientes y se suele dar una interacción bidireccional entre ellos (Somlyo y Somlyo, 1994).

3.1.1.1 Acoplamiento electromecánico

Este mecanismo implica cambios en el potencial de membrana de la CMLV. El potencial de reposo de estas células varía entre -50 y -60 mV. Cuando estos valores se vuelven menos negativos (despolarización), se activan los VOCC produciéndose la entrada de calcio y la consiguiente vasoconstricción (Somlyo y Himpens, 1989). La corriente de entrada de calcio activada durante la despolarización puede poner en marcha el proceso de CICR, visto anteriormente. Los cambios del potencial de membrana hacia valores más negativos (hiperpolarización), producen el cierre de los VOCC y disminuyen la $[Ca^{2+}]_i$ produciendo vasodilatación. La apertura de canales de potasio y la activación de la ATPasa Na^+/K^+ , son dos de los principales mecanismos responsables de la hiperpolarización de la membrana de las CMLV.

3.1.1.2 Acoplamiento farmacomecánico

Este mecanismo se basa en la unión de un agonista contráctil a un receptor provocando un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ sin un cambio previo en el potencial de membrana (Somlyo y Himpens, 1989). Aunque, estos cambios en el potencial de membrana pueden ocurrir de forma secundaria. Se han propuesto varios mecanismos de acoplamiento farmacomecánico. El más importante es aquel en el que el agonista se une a un receptor acoplado a proteína G, que activa la cascada de fosfatidilinositol aumentando los niveles de IP_3 y liberando Ca^{2+} del RS. Otro mecanismo algo más controvertido, es la estimulación de entrada de Ca^{2+} extracelular sin despolarización previa ya sea mediante el aumento de la probabilidad de apertura de los VOCC a un potencial de membrana constante, o la activación de canales operados por receptor ión inespecíficos (Orallo, 1996; Rembold, 1992; Somlyo y Himpens, 1989).

3.1.2 Contracción por sensibilización al calcio

La relación entre el alcance de la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ y el grado de desarrollo de tensión, varía dependiendo de la situación. Generalmente, la contracción mediada por receptor produce tensiones mayores que la despolarización de membrana, para una elevación específica de la $[Ca^{2+}]_i$. La relación Ca^{2+} -tensión también cambia a lo largo de la contracción. La fase sostenida de contracción se mantiene mediante unos niveles de $[Ca^{2+}]_i$ relativamente bajos. Cuando aparece una contracción mayor que la producida por una elevación específica de la $[Ca^{2+}]_i$, se le denomina sensibilización al Ca^{2+} del aparato contráctil o incremento de la sensibilidad al Ca^{2+} (Rembold, 1992; Somlyo y Somlyo, 1994). La sensibilidad al Ca^{2+} puede ser regulada mediante mecanismos dependientes o independientes de la fosforilación de la MLC20. El nivel de fosforilación de MLC20 se encuentra determinado por el balance entre los procesos de fosforilación y defosforilación de la Ca^{2+} -CaM-MLCK y la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) (Hirano, 2007; Somlyo y Himpens, 1989).

El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ proveniente de la activación de una proteína G acoplada a receptor (GPCR) o de una despolarización de membrana, activa la

MLCK. Aunque podría también activar otras proteínas como la Ca^{2+} -CaM dependiente de quinasa II (CaMK II), las proteínas quinasas A o C, proteína quinasa activada p-21 (PAK) o proteínas activada por mitógeno o de regulación extracelular (MAPK/ERK) que pueden regular la función de MLCK mediante fosforilación (Kamm y Stull, 2001; Yoshioka et al., 2007).

Aunque la fosforilación de MLC20 a través de MLCK es el principal evento de señalización en la iniciación de la contracción de CMLV, se debe de prestar especial atención a la regulación de la MLCP, puesto que su inhibición prolonga la contracción, como en los casos de mantenimiento de una contracción sostenida o del tono basal. La MLCP consta de tres subunidades: una subunidad catalítica de 37-38kDa (*type 1 serine/threonine phosphatase*, PP1c) y dos subunidades no catalíticas, la de 20kDa sin función conocida (M20), y la reguladora de 110-130 kDa que ancla MLCP a la MCL fosforilada (*myosin-targeting subunit of MLCP*, MYPT-1). Por lo tanto, aquellas quinasas que modulen la actividad de PP1c o MYPT-1, regularán la actividad de la MLCP y por lo tanto la contracción (Akata, 2007b; Buus et al., 1998; de Godoy y Rattan, 2011; Kimura et al., 1996).

3.1.2.1 Regulación por la familia Rho

RhoA pertenece a la familia de las GTPasas pequeñas, que incluye las isoformas RhoA, B y C. Rho A presenta mayor afinidad a la unión con la guanosina trifosfato (GTP) y difosfato (GDP). La forma activa de RhoA se encuentra unida a GTP en la membrana plasmática, y la forma inactiva se encuentra en el citoplasma unida a GDP. El paso de GDP a GTP lo controlan unos reguladores específicos GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) y los GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*). Los GEFs facilitan la unión RhoA-GTP, los GAPs facilitan la unión RhoA-GDP, y los GDI controlan la difusión de RhoA entre el citosol y la membrana.

ROCK es una quinasa específica de serina treonina del citoplasma que sirve como efector de RhoA (Leung et al., 1995; Matsui et al., 1996). La activación RhoA/ROCK está ligada a la activación de las proteínas G de la vía $\text{G}_{12/13}$. Cuando RhoA es activada, ROCK migra a la membrana e interacciona

con RhoA-GTP activándose. ROCK I y II son las isoformas que se expresan en músculo liso. Se cree que ROCK II es la principal isoforma implicada en la contracción, su mecanismo de acción es la inhibición de la defosforilación de MLC20 por parte de MLCP a través de la fosforilación de las subunidad MYPT-1 en la thr696 y thr853 (Akata, 2007b; de Godoy y Rattan, 2011; Hirano, 2007; Wang et al., 2009), aunque existe una amplia controversia en cuanto a cual es la isoforma implicada, y la inhibición sobre cual treonina implica mayor inactivación (Hirano, 2007; Muranyi et al., 2005), figura 5. Existen varios inhibidores de rho kinasa como son el Y27632 y el [1-(5-isoquinolinilsulfonil)-homopiperazina dihidroclorida], HA-1077 (HA), el cual a una concentración de 50µM en vena safena humana inhibe totalmente la precontracción inducida por 50µM de phe (Crowley et al., 2002), igual que ocurre en arteria mesentérica humana (Dai et al., 2010). Además, en aorta de conejo 0,3-3µM de HA inhibió la contracción de diversos vasoconstrictores (Asano et al., 1989).

La actividad de la MLCP puede verse regulada también por otras kinasas como la CPI-17 (*protein kinase C-potentiated phosphatase inhibitor*), que se ve regulada a su vez, por la propia ROCK y la PKC (Raina et al., 2009).

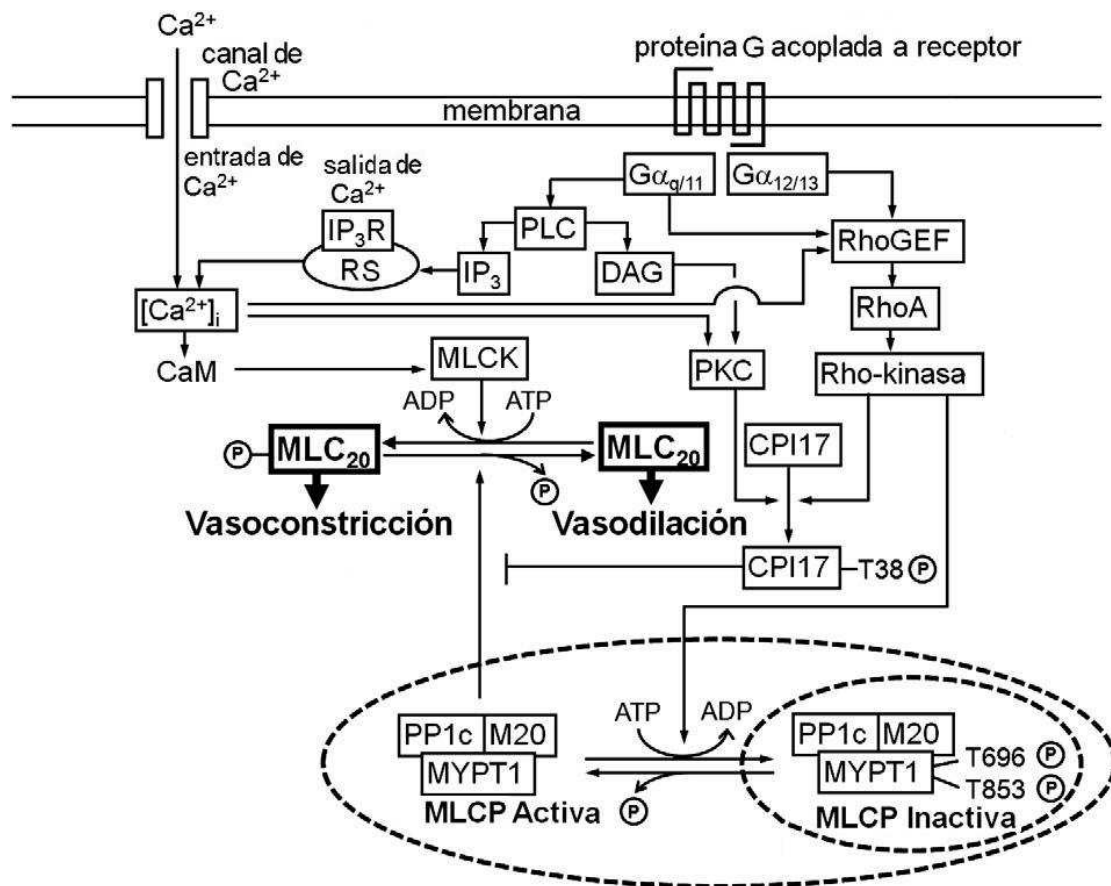


Figura 5: mecanismo de contracción del músculo liso vascular y sensibilización al calcio. Modificado de Matsuo, 2011.

3.2 Mecanismo de relajación del músculo liso vascular

La relajación de la CML vascular tiene lugar cuando disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ a menos de $1\mu M$ a nivel de las proteínas contráctiles. Esta disminución conlleva la disociación del complejo Ca^{2+} -CaM-MLCK y la regeneración de la MLCK inactiva, lo que permite la defosforilación de la MLC20 por medio de la MLCP, produciéndose relajación inactivando la ATPasa del complejo actina/miosina (Akata, 2007b; Somlyo y Somlyo, 1994). La reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ es el resultado de los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis vistos previamente.

4. EDAD Y FACTORES PATOLÓGICOS

4.1 Edad

El envejecimiento de la población fue uno de los eventos demográficos más importantes en el siglo XX, y de acuerdo al incremento en la expectativa de vida, la población anciana constituirá el 20% de la población mundial en los próximos 40 años. El envejecimiento se entiende como un proceso general, lento y pasivo influenciado por múltiples factores genéticos y ambientales (Docherty, 1990). De acuerdo con la teoría más ampliamente aceptada, el envejecimiento es el resultado de la acumulación durante la vida, de daños estocásticos en el ADN, al igual que sobre proteínas y lípidos, que resultan en modificaciones en la expresión de proteínas y en alteración de la función de moléculas claves de la célula (Hayflick, 2007). Es comúnmente aceptado que el envejecimiento no es una enfermedad, aunque la frontera entre envejecimiento normal o patológico es muy estrecha. Aún así existe una gran cantidad de manifestaciones del envejecimiento que no están relacionadas con la enfermedad, como el endurecimiento de los vasos sanguíneos, la flacidez de la piel, el agarrotamiento de las articulaciones, y que las estructuras moleculares de los organismos envejecidos son anormales (Gómez-Pinilla et al., 2006). El envejecimiento se encuentra asociado a una amplia variedad de alteraciones arteriales en las células, membranas y biomoléculas que forman parte del inicio y la progresión de las enfermedades cardiovasculares en personas ancianas. La morbilidad y mortalidad debidas a enfermedades cardiovasculares como la enfermedad coronaria arterial, arteriosclerosis, infarto, hipertensión e hipotensión postural, aumentan exponencialmente con la edad (Wang et al., 2010). Aún así, resulta difícil separar los cambios debidos puramente a la edad, de los problemas patológicos humanos.

En estudios con humanos, la población anciana se suele definir como aquellas personas que tienen más de 60, 65 ó 70 años, dependiendo del estudio (Docherty, 1990).

La capacidad de dilatación arterial disminuye a partir de la mediana edad, mientras que el endurecimiento arterial se incrementa marcadamente con la

edad. Las paredes arteriales se remodelan con la edad, en concreto la intima altera en una alta proporción su volumen y su contenido (Wang et al., 2010).

La presencia de cambios relacionados con la edad conllevó a proponer la "teoría del calcio en la edad" (Gómez-Pinilla et al., 2007). La cual propone que estos cambios pueden estar relacionados con la homeostasis del calcio y la citotoxicidad, que se relacionan con enfermedades degenerativas. Así, la acumulación de Ca^{2+} en el citoplasma con el consecuente incremento $[\text{Ca}^{2+}]_i$, puede ser debido a las alteraciones en la amortiguación del Ca^{2+} por el RS y las mitocondrias, produciéndose sobrecarga de dichos orgánulos (Pottorf et al., 2000; Rubio et al., 2002), a una posible disminución de la sensibilidad de los IP_3R (Wen et al., 1999) y a las modificaciones oxidativas que sufren proteínas involucradas en la señalización del Ca^{2+} , como la Calmodulina y la SERCA, que conllevan a su inhibición (Gómez-Pinilla et al., 2007). Todo esto podría derivar en estrés oxidativo y disfunción durante el envejecimiento (Barja, 1998; Buchholz et al., 1996), que producirían alteraciones en las respuestas contráctiles a agonistas, daño tisular y la consecuente muerte celular (Lopes et al., 2006; Puzianowska-Kuznicka y Kuznicki, 2009).

4.2 Factores patológicos

Al igual que la edad, existen otros factores que pueden estar interrelacionados, como veremos más adelante, como son: género, diabetes, sedentarismo, tabaquismo, hipercolesterolemia, hipertensión, obesidad y neoplasia, que son considerados factores de riesgo cardiovascular que podrían suponer cambios en la contractilidad vascular, en los mecanismos de acción de la contracción y en la homeostasis del Ca^{2+} , en mayor o menor medida.

El tabaquismo se muestra como un fuerte factor de riesgo cardiovascular, como se observó en cardiomiocitos de rata, donde aquellas sometidas a altas concentraciones de monóxido de carbono sufrían una reducción de la función contráctil, al reducir en un 48% la amplitud de Ca^{2+} intracelular o en un 34% la función de SERCA, dando lugar a una disfunción en la homeostasis del Ca^{2+} (Bye et al., 2008), o produciendo incrementos en las respuestas contráctiles dependientes de proteínas G acopladas a receptor, en arterias mesentéricas de

rata (Xu et al., 2010). Otro factor de riesgo cardiovascular es la hipercolesterolemia, que incrementa la sensibilización al Ca^{2+} en CML de arteria coronaria humana por medio del colesterol (Morikage et al., 2006), y que aumenta la respuesta contráctil a histamina y noradrenalina en arterias penianas dorsales de conejo (Martínez et al., 2006).

Por otro lado, en pacientes con neoplasia, se dan distintas respuestas arteriales dependientes de la especie, el procedimiento experimental y el tipo de tumor, así puede ser que la sensibilidad a endotelina 1 pero no la respuesta contráctil máxima se vea incrementada en arterias que abastecen a tumores colorectales y no en arterias mesentéricas que abastecen a colon normal o arterias sin patologías tumorales (Ferrero et al., 2008). Si bien, en aorta de rata incubadas con tumores de hepatocarcinoma o melanoma, se ve una disminución en la contractibilidad en respuesta a fenilefrina (Morissette et al., 2004).

En cuanto al sexo del paciente, se han observado diferencias en la presión sanguínea asociadas al género en un gran número de estudios epidemiológicos, aunque los mecanismos derivados de éstas no han sido descubiertos en su totalidad. La presión sanguínea es mayor en hombres que en mujeres de edades similares y existe una menor incidencia de hipertensión en mujeres premenopáusicas que en hombres (Reckelhoff, 2001). Se ha propuesto la existencia de diferencias específicas entre géneros en el control del tono vascular de CMLV. Tanto las vías de señalización como los sistemas y orgánulos implicados en la contractilidad son diferentes entre sexos (Devynck, 2002). Murphy y Khalil en el año 2000, observaron en aorta de rata una influencia directa del género en los mecanismos de transporte de Ca^{2+} y la contractilidad de CMLV. Al igual que ocurre en vena cava de rata, donde además, la contracción adrenérgica y la sensibilidad al Ca^{2+} se encuentran reducidas en hembras con respecto a machos (Xia y Khalil, 2009). Incluso en ratas espontáneamente hipertensas propensas a infartos, los machos mostraban mayor incremento de la contracción durante el periodo de recarga de Ca^{2+} , además de mayor expresión y actividad de las proteínas STIM1 y Orai1 (Giachini et al., 2012).

La Diabetes Mellitus (DM) es otro gran factor de riesgo cardiovascular, que se puede definir como un grupo de desórdenes metabólicos caracterizados por la presencia de hiperglucemia, como resultado de una falta de secreción de insulina,

fallo en la acción de la insulina o ambas. Es una enfermedad crónica que afecta al metabolismo de los carbohidratos, las proteínas y las grasas, y que lleva a una serie de alteraciones crónicas y graves, con afectación multiorgánica. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Diabetes Mellitus se define por los niveles de glucosa en sangre en ayunas $>126\text{mg/dl}$ ($7,0\text{mmol/l}$), o por los resultados del test oral de tolerancia a 75 gr de glucosa, situando los niveles de corte de glucosa en plasma en 200mg/dl ($11,1\text{mmol/l}$) tras 2 horas de haberla ingerido. (American Diabetes, 2010). La diabetes afecta a diversos mecanismos celulares en arterias humanas, causando disfunción vasomotora. La estimulación de arterias diabéticas se traduce en un aumento de la vasoconstricción normal, debido a disfunción endotelial y a un incremento en la contractilidad de las CMLV (Okon et al., 2005), debido entre otros factores a una disfunción en la señalización de Ca^{2+} que incluye liberación anormal de Ca^{2+} (Cheng y Lederer, 2008) y alteraciones en la actividad de las bombas de Ca^{2+} (Marin et al., 1999). Diabetes, obesidad e hipertensión están íntimamente relacionadas, el 15% de la población de países desarrollados presentan "diabetesotensión" (Sharabi, 2012). La obesidad se define según el índice de masa corporal (IMC) que se calcula como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros, y se divide en tres grupos, peso normal con IMC 18,5-24,9; sobrepeso con IMC 25-29,9; y obeso con IMC superior a 30 (Wilson et al., 2002), mientras que los límites de hipertensión se encuentran marcados en 140/90 mm de Hg, aunque no son límites estrictos. La hipertensión es la enfermedad más común en el mundo y la obesidad contribuye de una forma muy potente a su desarrollo al igual que al de la diabetes. Además de que la diabetes duplica las posibilidades de desarrollar hipertensión y viceversa. Cada una de estas condiciones se asocia a un incremento en el riesgo de sufrir daño y complicaciones micro y macrovasculares que tienen gran incidencia en la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Sharabi, 2012). El estudio Framingham revela que al ser obeso existe un 30% más de riesgo de sufrir hipertensión (Wilson et al., 2002). De hecho, en estudios con ratas obesas la elevación de la presión sanguínea estaba producida por un aumento en la contractilidad vascular. La hipertensión inducida por obesidad se asoció con un descenso en la relajación de la arteria coronaria producida por la entrada de calcio extracelular a través de canales tipo L, aumentándose la respuesta vascular (Boustany-Kari et al., 2007).

Por todo esto, realizar ejercicio regularmente es beneficioso para los sistemas cardiovasculares produciendo una importante mejora en las funciones cardiovasculares (Shi et al., 2012). Esta mejora en el perfil cardiovascular se puede relacionar con la edad, aunque está más relacionado directamente con los vasos de resistencia en jóvenes y con los vasos grandes en ancianos (McDonnell et al., 2013), con lo que el sedentarismo, aunque no de una forma directa, podría considerarse otro factor de riesgo cardiovascular.

II. Objetivos

Alrededor de los años 70, surgió un importante interés científico acerca del funcionamiento de la mecánica contráctil de la musculatura lisa vascular (Bremel, 1974; Devine et al., 1972; Gabella, 1971; Hurwitz et al., 1967; Somlyo y Somlyo, 1968). Desde entonces se ha buscado caracterizar los mecanismos a través de los cuales se iniciaba y se mantenía la contracción, comparándolos con los mecanismos producidos en musculatura esquelética y enfrentándose al hecho de que sus características eran distintas (Sobieszek y Bremel, 1975). Por lo tanto, se debía de investigar por separado, y de ahí surgieron un gran número de nuevas investigaciones, tanto de los mecanismos y procesos de contracción (Itoh et al., 1981; Mulvany y Halpern, 1977; van Breemen, 1977), como de los orgánulos implicados en ella (Casteels y Droogmans, 1981). Los estudios fueron haciéndose más específicos, centrándose en canales (Ashida et al., 1988; Nelson et al., 1990; Pacaud et al., 1991), movimientos intracelulares de calcio (Berridge y Galione, 1988; Goldbeter et al., 1990), y procesos de sensibilización (Asano et al., 1989; Rembold, 1990). Todos estos estudios y los subsiguientes, que incrementaron el conocimiento acerca de tales procesos, se realizaron habitualmente por separado, en animales de experimentación (Iino et al., 1994; Lee et al., 2002a; Peng et al., 2001; Xia y Khalil, 2009), células musculares lisas vasculares aisladas (Avedanian et al., 2010; Otun et al., 1992) e incluso venas, tanto animales (Ruehlmann et al., 2000) como humanas (Crowley et al., 2002).

Aun así, este conjunto de hallazgos no se han estudiado en arterias humanas. Por lo tanto, nos propusimos los objetivos de la presente tesis:

1. Dilucidar y caracterizar el mecanismo de acción, a través del cual se produce la contracción inducida por un agonista α -adrenérgico (fenilefrina), en la arteria mesentérica humana, y las posibles diferencias en la edad y frente a distintas patologías.

2. Determinar si se producen movimientos de calcio intracelulares, describirlos y caracterizarlos para comprobar si la contracción es dependiente de ellos.

3. Comprobar, dependiendo de su proximidad a la membrana plasmática, si el proceso de contracción es dependiente de reservorios intracelulares de almacenamiento de calcio, como el retículo sarcoplásmico.

4. Determinar si los niveles de expresión de las proteínas Rho A, ROCK I y ROCK II varían según la edad. Comprobar si el nivel de fosforilación inducida por fenilefrina de la subunidad de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina MYPT1 varía con la edad y en función del tiempo, y si el inhibidor de la Rho kinasa (HA-1077) produce inhibición de dicha fosforilación.

III. Material y métodos

Para la realización de todos los experimentos de la presente tesis doctoral se utilizan arterias mesentéricas (AM) humanas provenientes de pacientes sometidos a cirugías abdominales, realizadas en el Servicio de Cirugía II del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid. De acuerdo a la declaración de Helsinki, las muestras se obtienen tras la aprobación del comité ético del hospital y con el consentimiento del paciente.

Tras la extracción del tejido en la cirugía, éste se coloca en un tubo falcon con medio de cultivo RPMI 1640 estéril + 1% de antibiótico a 4°C y se mantiene en nevera hasta su transporte al laboratorio. Al tratarse de tejido humano y considerarse material peligroso, se utilizan guantes y se limpia con mucha precaución el segmento arterial colocando la muestra en solución salina fisiológica (SSF) fría, eliminando todo tejido graso y conectivo circundante, con la ayuda de unas pinzas y tijeras de microdissección, bajo una lupa binocular, manteniendo el tejido frío y burbujeado con carbógeno (solución gaseosa, mezcla de CO₂ 5% + O₂ 95%). Para los distintos experimentos los segmentos de arteria son tratados de distinta forma como veremos en cada apartado.

El estudio engloba AM provenientes de pacientes desde los 17 a los 85 años. La información disponible de los pacientes es: edad, género, diabetes, sedentarismo, obesidad, fumador, hipercolesterolemia, hipertensión y neoplasia. En todos los casos los pacientes se sometieron a cirugías de las cuales se obtuvieron nuestras muestras, por ello las muestras podrían haber sufrido algún tipo de daño durante la operación, el almacenaje, el transporte o su limpieza en el laboratorio. Los posibles traumas que pueden haber sufrido dichas arterias en su manejo son los siguientes:

- Daño mecánico y/o pérdida de la capa adventicia por el manejo instrumental en el quirófano (uso de clips, extirpación de ramas laterales, suturas, mallas metálicas, grapas y cauterización).
- Isquemia por el bloqueo de los vasa vasorum o por almacenaje en condiciones de hipoxia.
- Daño químico o térmico por la exposición a soluciones salinas no fisiológicas con pH, osmolaridad y temperatura variables.

- Distensión manual bajo presiones no controladas para evitar áreas espasmódicas.
- Exposición a distintos vasodilatadores o vasoconstrictores.

1. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

1.1 Protocolo de disección, montaje y normalización

Para estudiar la reactividad vascular se utiliza la metodología descrita por Mulvany y Halpern (1977). De éste modo, las AM una vez limpias, se cortan en anillos de 2mm de longitud y se montan en los baños, con SSF fría, de un miógrafo multicanal isométrico Danish Myo Technologies 610M, figura 6:



Figura 6: miógrafo multicanal 610M de Danish Myo Technologies (DMT).

Para ello, se introduce un alambre de tungsteno de 40 μ m por el interior de la luz del vaso, asegurándolo con tornillos al cabezal conectado a un tornillo micrométrico, e introduciendo otro alambre que se asegura con tornillos a otro cabezal, que está conectado a un transductor de fuerza, el cual envía la información al ordenador, donde se procesará por medio del programa Myodata 2.02, myograph data analysis software de Labview National Instruments Corporation. En el caso de que el segmento arterial sea de un diámetro grande, los cabezales son sustituidos por dos barras paralelas de 200 μ m de diámetro que serán introducidas en la luz del anillo, figura7:

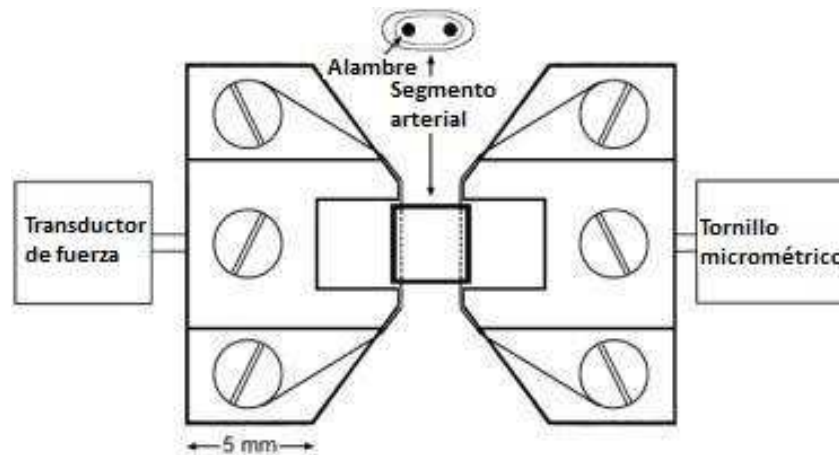


Figura 7: esquema de montaje de arteria en los cabezales de un miógrafo.

Una vez montados los anillos, se dejan estabilizar durante 30 minutos a 37°C oxigenados con carbógeno. Tras su estabilización, se procede a la normalización del vaso, es decir, determinar informáticamente la relación entre la tensión de reposo de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso, calculando a partir de este punto la circunferencia interna (L_{100}) correspondiente a una presión transmural de 100 mm de Hg para un vaso relajado *in situ*. A continuación, las arterias se estiran hasta una circunferencia interna L_1 , siendo $L_1 = 0.9 \times L_{100}$, circunferencia a la cual el desarrollo de fuerza es máximo en estas arterias. El diámetro luminal interno efectivo de cada arteria se determinó como $l_1 = L_1/\pi$. Este protocolo permite establecer el diámetro idóneo de trabajo para cada preparación.

1.2 Protocolo experimental

Una vez calculado el diámetro interno de trabajo de las preparaciones (l_1) y estiradas con el tornillo micrométrico hasta el nivel indicado por el programa informático, se comprueba la viabilidad de las preparaciones mediante su exposición por dos veces a una SSF enriquecida en K^+ (80mM).

Tras lavar las preparaciones los anillos se precontraen con una única dosis de fenilefrina (phe) 10 μ M y una vez la precontracción se estabiliza, cada anillo se expone a un fármaco distinto, en este estudio se utilizan 6 fármacos vasodilatadores:

- Nifedipina (1 μ M): bloqueante de los canales de calcio activados por voltaje tipo L. Primera dilución en metanol y siguientes en agua destilada (DDH₂O).
- KB-R7943 (10 μ M): inhibidor de la bomba de intercambio Na⁺/Ca²⁺ en su modo inverso. Diluido en Dimetil sulfóxido (DMSO).
- SKF-96365 (50 μ M): bloqueante de los canales operados por receptor y por liberación de calcio desde orgánulos de almacenamiento. Diluido en DMSO.
- HA-1077 (50 μ M): inhibidor de la enzima Rho kinasa. Diluido en DDH₂O.
- 2-APB (50 μ M): bloqueante de los canales de inositol tri fosfato del retículo sarcoplásmico. Diluido en DMSO.
- CPA (1 μ M): inhibidor de la bomba de calcio ATPasa sarco/endoplasmática (SERCA). Diluido en DMSO.

Tras la primera relajación, los vasos se lavan 3 veces 10 minutos cada uno y se vuelven a precontraer. Aquellos que muestran una buena y estable contracción vuelven a ser sometidos a una relajación con otro de los vasodilatadores nombrados previamente.

1.3 Productos utilizados

1.3.1 Líquidos nutricios

- Solución salina fisiológica:	mM/L	gr/2L
- Cloruro sódico (NaCl):	140	16,36
- Cloruro potásico (KCl):	5	0,74
- Cloruro cálcico (CaCl ₂):	1,5	0,34
- Cloruro magnésico hexahidratado (MgCl ₂):	1	0,4
- Glucosa:	10	3,6
- HEPES:	5	2,38

- Solución salina fisiológica enriquecida en potasio:	mM/L	gr/0.5L
- Cloruro sódico (NaCl):	65,9	1,9
- Cloruro potásico (KCl):	80	2,98
- Cloruro cálcico (CaCl ₂):	1,5	0,085
- Cloruro magnésico hexahidratado (MgCl ₂):	1	0,1
- Glucosa:	10	0,9
- HEPES:	5	0,595

1.3.2 Reactivos

- Fenilefrina (Sigma- Aldrich)
- Nifedipina (Sigma- Aldrich)
- KB-R7943 (Calbiochem)
- SKF-96365 (Sigma- Aldrich)
- HA-1077 dihidroclorido (Sigma- Aldrich)
- 2-Aminoetoxidifenil borato (2-APB) (Tocris)
- Ácido ciclopiazónico (CPA) (Sigma- Aldrich)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Cloruro potásico (Panreac)
- Cloruro cálcico (Panreac)
- Cloruro magnésico hexahidratado (Panreac)
- Glucosa (Sigma- Aldrich)
- HEPES (Sigma- Aldrich)
- Metanol (Sigma-Aldrich)
- DMSO (Sigma-Aldrich)

1.4 Análisis de los resultados

Las respuestas mecánicas de los vasos se expresan como tensión activa, es decir, el incremento de la fuerza (ΔF , mN) registrada dividido por dos veces la longitud del segmento arterial (a , m):

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

La relajación máxima de los vasodilatadores viene expresada como porcentaje de la respuesta contráctil máxima inducida por phe (10 μ M).

Se dividen los pacientes en 3 grupos de edad: jóvenes (17-40), adultos (41-65) y ancianos (66-83). Para cada tratamiento, los porcentajes de relajación se exponen en gráficas de barras por grupo de edad, como media de los valores y su error estándar de la media, y se realiza un test estadístico no paramétrico (los datos no presentaron normalidad al hacer un test de D'Agostino Pearson, o por falta de número muestral no se pudo realizar), denominado Kruskal-Wallis, seguido de un *post test* de Dunn en el que se comparan los grupos de edad. Para ambos test se toma un P valor < 0,05 como estadísticamente significativo. Se realizan las gráficas y los análisis con el programa estadístico GraphPad Prism 5.

2. ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL CON REACTIVIDAD VASCULAR

2.1 Protocolo de disección, montaje y normalización

Las AM limpias se cortan en anillos de 2mm de longitud, dependiendo del diámetro y grosor de las arterias, dichos anillos son invertidos dejando expuesta la pared muscular, puesto que la capa endotelial es raspada y eliminada por medio del raspado suave de la monocapa de células endoteliales con las pinzas de microdisección. Se procede a la incubación de los segmentos arteriales en el fluoróforo para calcio Fluo-4 AM (5 μ M+5 μ M de Pluronic F-127) durante 45

minutos a 37°C, una vez incubados se realizan 3 lavados de 10 minutos en SSF y se transportan al Centro de Microscopia y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid.

Una vez allí, se sitúa sobre la pletina de un microscopio confocal BioRad MRC 1024 con estativo invertido Nikon Eclipse TE 300, un miógrafo individual 310A de Danish Myo Technologies, donde se monta y normaliza cada anillo de la forma previamente descrita en el apartado 1.1, figura 8.

A



B



Figura 8: A. Microscópio confocal MRC 1024 de Biorad. B. Miógrafo 310 A de DMT.

2.2 Protocolo experimental

Una vez se ha situado el miógrafo sobre la pletina y el segmento arterial ha sido normalizado, se procede a seleccionar el láser de ión argón de 25mW para 488nm y a enfocar la muestra de forma manual a través de un objetivo 20x. Tras enfocar la muestra manualmente, se procede a enfocar y seleccionar la zona de donde vamos a grabar el video del experimento con el software Laser Sharp 2000.

Se programa el experimento para una captura de video de 900 ciclos (aprox. 1,25 segundos/ciclo) y se inicia el experimento. Tras 150 segundos se aplica una dosis de phe 10 μ M y tras 300 segundos se añade uno de los siguientes 4 vasodilatadores: nifedipina, HA-1077, 2-APB o CPA. Al mismo tiempo se toma información de la reactividad vascular por medio del miógrafo al igual que en el apartado 1.2.

2.3 Productos utilizados

Se utilizan la misma SSF y reactivos (excepto KB-R7943, y SKF-96365) que en el apartado 1, además de los siguientes reactivos:

- Fluo-4,AM (Invitrogen)
- Pluronic F-127 (Sigma- Aldrich)

2.4 Análisis de los resultados

De los videos obtenidos se utiliza el más representativo de cada tratamiento, en ellos se seleccionan varias regiones de interés (ROI) que representan cada una a una célula. Estas regiones proporcionan los datos representados en las gráficas, observándose el comportamiento de cada célula en cada momento. Se seleccionan 10 tiempos que se muestran en 10 imágenes capturadas de los videos. Por último, se realiza la media de las ROIs seleccionadas y se representa frente a la gráfica de contractilidad. Los

resultados se explican descriptivamente a través de los procesos observados para cada experimento realizado con cada tratamiento.

3. ESTUDIO ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.1 Protocolo de disección y preparación de las muestras

El proceso de transporte de las muestras desde el quirófano es distinto en este tipo de experimentación, puesto que para conservar los tejidos lo más completos posibles es necesario que una vez sacada la muestra del paciente, ésta se introduzca lo más rápidamente posible en una solución de fijación (glutaraldehído 2,5% + paraformaldehído 4% en tampón cacodilato 0,1M) que permite la conservación de las estructuras. El transporte se realiza en hielo y el proceso de limpieza, de la forma habitual, en frío, en la misma solución de fijación. Las arterias se cortan en segmentos de 2mm de longitud y se colocan en solución de fijación nueva dejándolas fijando de 4-6 horas a 4°C.

Posteriormente se lavan los anillos con solución de tampón cacodilato 0,1M, 5 veces cada 30 minutos y se guardan a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se comienza con el proceso de post fijación colocando los anillos en una solución de post fijación (tetróxido de osmio 1% + ferrocianuro potásico 3%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto se hacen 3 lavados con agua destilada de 10 minutos cada uno y se procede a la deshidratación de las muestras introduciendo los anillos en concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%) cada 15 minutos y finalmente, tres lavados de 10 minutos cada uno con acetona pura.

El siguiente paso es la infiltración en un medio de resinas, incluyendo los anillos una hora en 3 partes de acetona más una parte de resina, luego otra hora 2 partes iguales y por último 2 horas en una parte de acetona a 3 de resina, para por último se introducen los anillos en resina pura toda la noche a temperatura ambiente sin recibir luz.

El último paso en el laboratorio antes de llevarlo a procesar al centro de microscopía electrónica es colocar los anillos en un molde con resina pura nueva durante 8 horas a 60°C.

Los bloques de resina se trasladan al centro de microscopía electrónica donde los técnicos efectúan las siguientes operaciones usando el ultramicrotomo:

- Tallar (*trimming*) el bloque en forma de pirámide truncada.
- Obtener cortes gruesos (0,1-0,5 μm aprox.) para confirmar la calidad de la inclusión y seleccionar la región donde se obtendrán los cortes finos.
- Obtener los cortes finos (80nm) con un ultramicrotomo con cuchilla de diamantes.
- Recoger los cortes en rejillas preparadas con membrana de soporte.

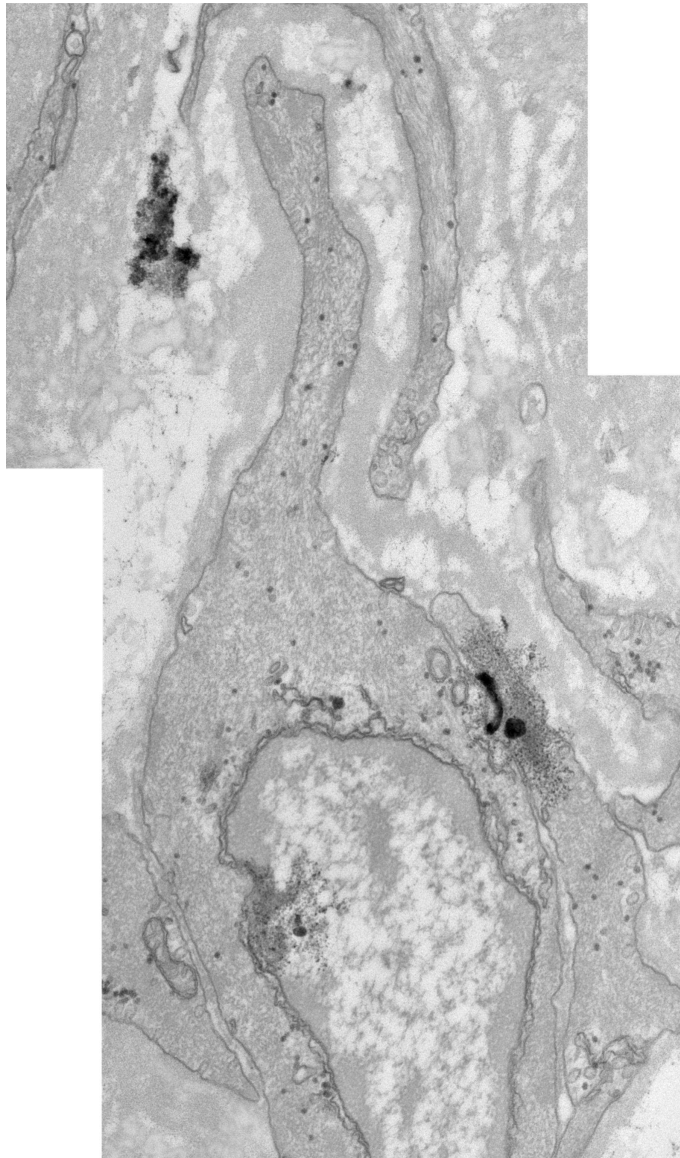
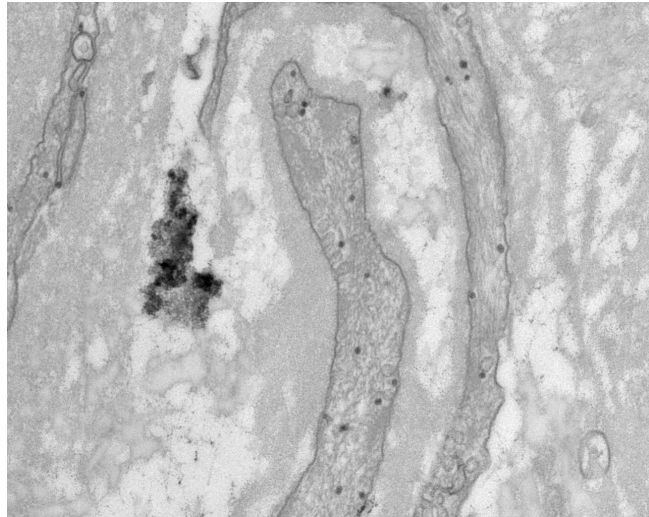
Previamente a la observación de las secciones, se debe de conferir contraste a los cortes obtenidos. Para esto se utilizan soluciones de sales de metales pesados (citrato de plomo 3 minutos y acetato de uranilo 4 minutos), las cuales contienen iones de alto número atómico, es decir, con un importante número de electrones y protones capaces de desviar el haz de electrones incidente sobre la muestra y con cierta afinidad por componentes específicos de la misma.

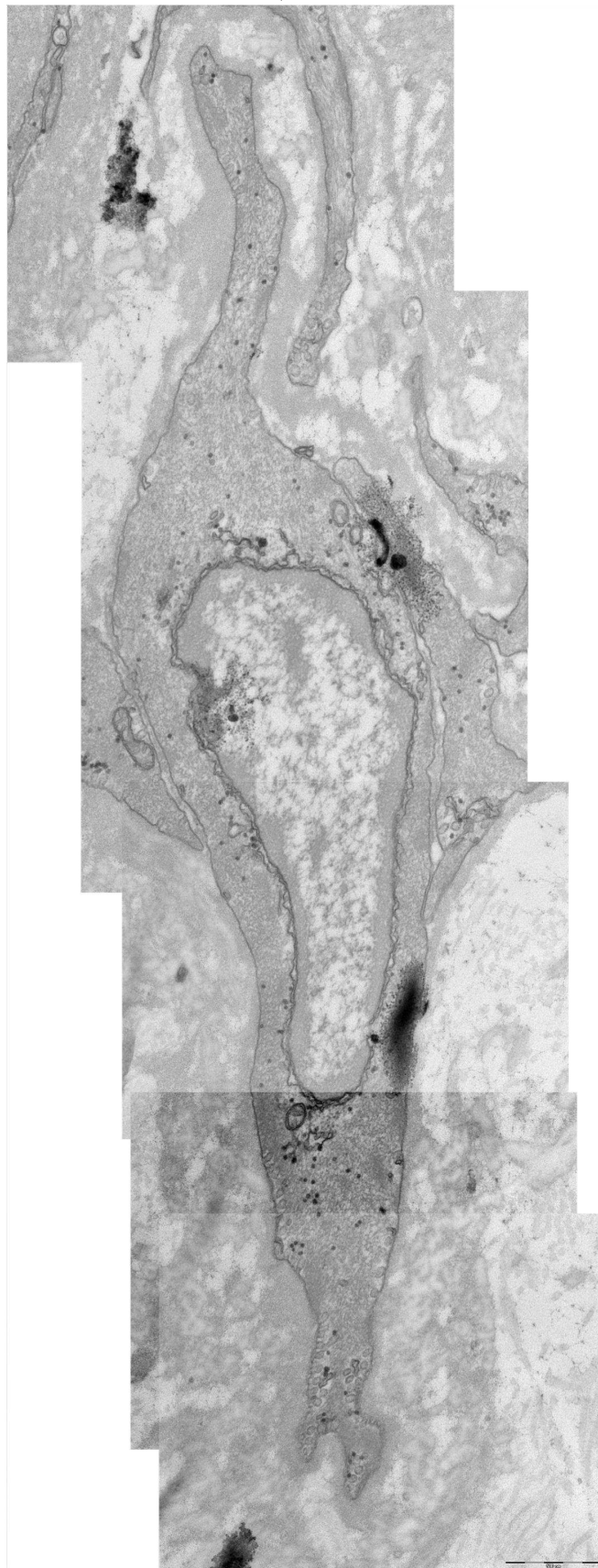
3.2 Protocolo de obtención de imágenes

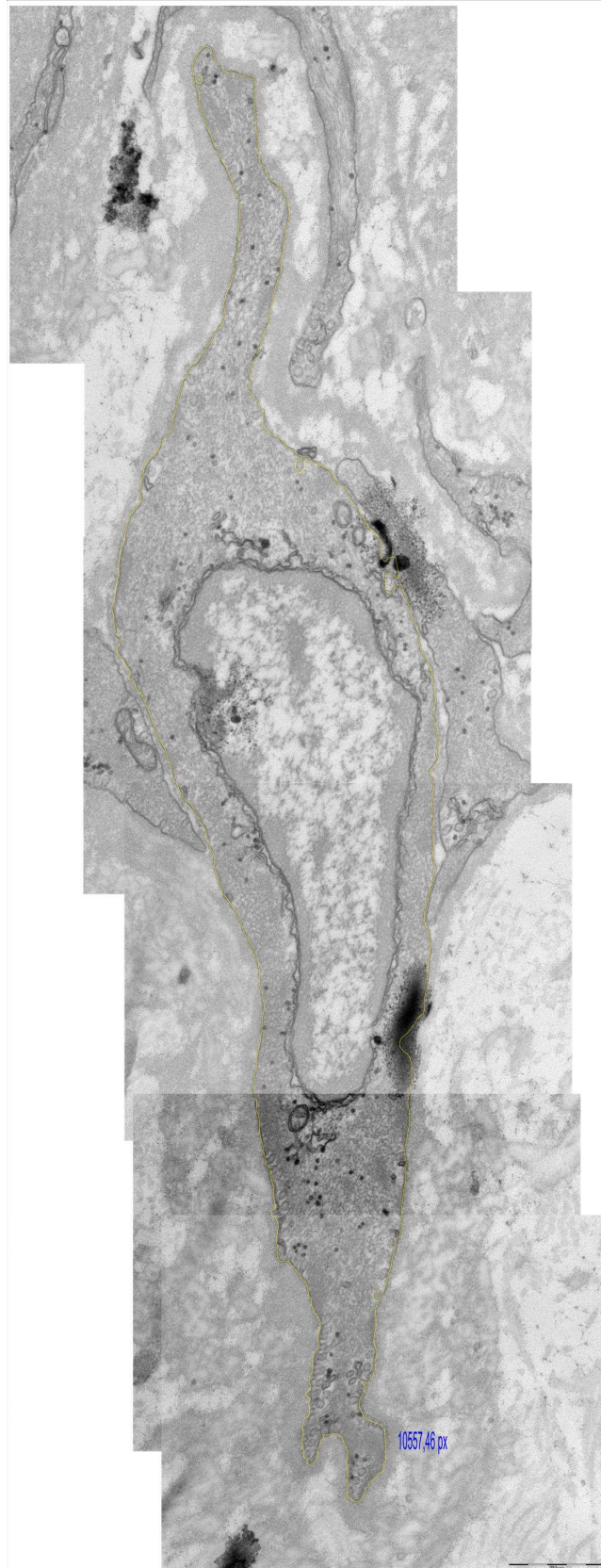
Las imágenes se obtienen con la ayuda de un técnico especialista en el uso de un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución Jeol JEM-1010 (JEOL, Tokyo, Japón).

Las células de las imágenes se eligen aleatoriamente y las imágenes se capturan en serie con la finalidad de poder reconstruir las células posteriormente en ordenador en el laboratorio. De cada paciente se capturan imágenes de 3 células distintas.

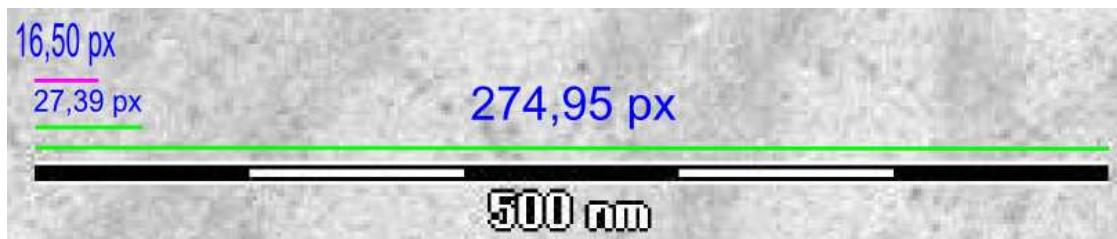
Una vez en el laboratorio se unen las imágenes para formar cada célula:



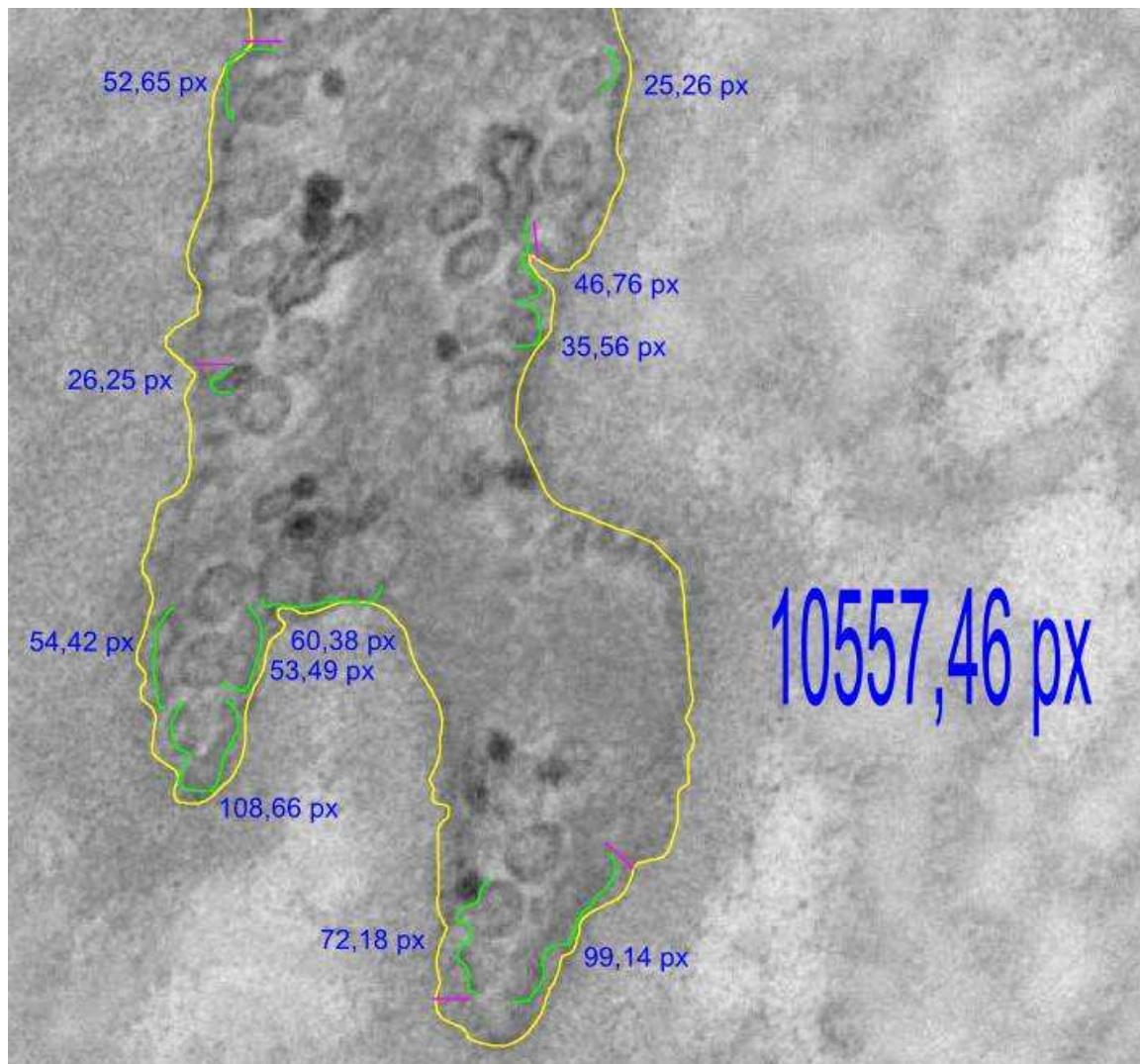




Se traza, según la forma de la célula, el perímetro siguiendo el curso de la membrana plasmática (MP) y se calcula la cantidad de píxeles que mide.



Las imágenes poseen una barra a escala de 500nm (274,95 píxeles) que se divide hasta obtener una barra de 30nm (16,50 píxeles), que se utiliza para medir la máxima separación de retículo sarcoplásmico (RS) superpuesto a MP.



Para trazar la cantidad de RS, se procede a delimitarlo según la distancia a la MP con la barra de 30 nm, se delinea siguiendo la membrana del RS y se mide, obteniendo así la cantidad de RS enfrente a MP a una distancia máxima de 30nm en cada célula. Este proceso fue realizado en el sistema operativo Suse Linux, por medio del programa de libre acceso Inkscape 0.47.

3.3 Productos utilizados

- Glutaraldehido (TAAB)
- Paraformaldehido 16%(Electron Microscopy Sciences)
- Cacodilato sódico (FEDELCO)
- Tetróxido de osmio 2%(TAAB)
- Ferrocianuro potásico (Panreac)
- Acetona (Panreac)
- Medio de resinas para inclusión Spurr (TAAB)
- Citrato de plomo
- Acetato de Uranilo

3.4 Análisis de los resultados

Se representa en una gráfica de barras los valores de % de RS-MP de cada paciente por edad, como media y su error estándar de la media. Se realiza un test de Kruskal-Wallis (no se pudo realizar test de normalidad al no tener suficientes valores), con *post test* de Dunn para comparar el % de RS-MP entre pacientes representados por su edad. Se toma un P valor < 0,05 como estadísticamente significativo, realizándose las gráficas y el análisis con el programa estadístico GraphPad Prism 5.

4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RHO A, ROCKS I/II Y P-MYPT1/MYPT1 POR WESTERN BLOTTING

4.1 Protocolo de obtención de células

Este protocolo se realiza en una campana de flujo laminar Telstar. La limpieza de la arteria se realiza sobre una placa petri donde tras limpiarla, se abre la arteria por la mitad y raspa suavemente la pared endotelial para eliminarla, posteriormente se utiliza una solución de colagenasa al 4,5% para la disgregación y eliminación del tejido, parte de ella se coloca en otra placa petri donde se procede a cortar la arteria en trozos lo más pequeños posibles. El siguiente paso es un proceso de digestión celular para la obtención de células. En este proceso se introduce la arteria cortada en el medio de colagenasa en un tubo falcon de 15ml que se coloca en un incubador (Inco 2 de Memmert) a 37°C con 5% de oxígeno y 95% de humedad, durante tres horas agitando suavemente el tubo cada hora, mientras hace efecto la colagenasa. Pasadas las 3 horas se procede a centrifugar el tubo en una centrifuga para tubos falcon (Labofuge 300 de Heraeus) 7 minutos a 1000 r.p.m. Posteriormente se elimina el sobrenadante y se resuspende en medio RPMI completo (RPMI 90% + 10% suero fetal bovino + 1% antibiótico + 0,2gr de glutamina filtrada), se agita y se vuelve a centrifugar en idénticas condiciones para resuspender de nuevo y pasar el líquido con las células a una botella de cultivos F25 (pequeña) que ha sido previamente introducida con un poco de medio de cultivo RPMI completo en el incubador. Se deja que se peguen a la pared de la botella y que crezcan las células de músculo liso vascular (CMLV) cambiándolas de medio y obteniendo así nuestra nueva línea celular.

Una vez las células han crecido y ocupan el 90% de la superficie de la placa se procede a realizar un pase celular, para ello se elimina el medio y se realizan 3 lavados con PBS a 37°C, posteriormente se añade 1 ml de tripsina y se introduce la placa en el incubador. Pasados 2-3 minutos se golpea la placa suavemente para que se terminen de despegar las células y se procede a añadir 3 veces más medio de cultivo por cada ml de tripsina utilizada, para antagonizarla, se recoge todo el líquido de la botella y se reparte en 3 botellas de

cultivo celular F25. Se realizan los cambios de medio de cultivo necesarios para que las células crezcan y al llegar de nuevo al 90% se realiza el segundo pase, esta vez pasando el líquido de cada botella F25 a una F75 (grande). Para el tercer pase se sigue el mismo proceso añadiendo esta vez 3 ml de tripsina y el líquido de cada botella grande irá a 3 botellas F75. Una vez las células alcanzan de nuevo un 90% de confluencia se procede a realizar un proceso de congelación.

Para congelar las células se tripsinizan y centrifugan a 800 r.p.m durante 3 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 3ml de medio de congelación (suero fetal bovino + 10% DMSO). Estos 3ml se ponen en 3 viales de congelación (Costar, Corning, EEUU) de un ml cada uno. Los viales se cierran herméticamente y una vez etiquetados se colocan una hora a -20°C , posteriormente se mantienen a -80°C durante 24 horas y por último se colocan en las cajas del tanque de nitrógeno líquido a -273°C .

4.2 Protocolo experimental y realización de western blotting

Para realizar este protocolo experimental es necesario descongelar células de las obtenidas previamente, para ello conviene descongelar 2 ó 3 viales puesto que la supervivencia celular en estos casos no está siempre asegurada. Se llenan dos vasos de agua del grifo a 40°C y se ponen los viales en uno de los vasos con agua y tras unos segundos se pasan al otro. Una vez descongelados se llenan 3 botellas F25 con medio de cultivo puestas previamente en la campana y se añade en cada botella el contenido de cada vial. Tras 24-48h, se cambia el medio y se deja crecer las células según el proceso anteriormente descrito.

Para la medición de RhoA (21 Kd), Rock I y II (160 Kd) se utilizan proteínas obtenidas directamente de las líneas celulares sin tratar tras realizar un cuarto pase. En el caso de P-MYPT1/MYPT1 (140 Kd), una vez se les ha realizado el cuarto pase a las células de la botella F25 donde fueron descongeladas, a una botella F75 y tras alcanzar el 90% de confluencia, se tripsinizan y se pasan a 5 placas de 6 pocillos (Falcon) donde se les dejan crecer. Estas placas se subdividen en futuros distintos tratamientos con dos

replicas por placa. En la primera placa se dejan dos pocillos para control, es decir sin tratamiento, otros dos pocillos se tratan con phe 10 μ M y otros dos con phe 10 μ M + HA-1077 50 μ M, introduciendo la placa durante 7 segundos en la estufa a 37°C. Para las demás placas se dejan dos pocillos libres y se añaden los mismos compuestos que en la primera placa pero se introducen durante distintos tiempos, 15 y 30 segundos, y otras dos 1 y 5 minutos. Una vez las células han ocupado el 90% del pocillo se procede a realizar dicho protocolo experimental y posteriormente la extracción celular de proteínas para la realización del western blot.

El proceso de extracción celular se realiza en cada placa por separado, realizando el protocolo experimental. Una vez se saca la placa del incubador se coloca sobre hielo, se vacía de líquido cada pocillo y se lavan con PBS frío, para luego añadir 100 μ l de buffer de lisis a cada pocillo. Por último se raspa la superficie de cada pocillo con un rascador y se guarda el líquido de consistencia lechosa de la extracción en un tubo eppendorf que se etiqueta y se congela a -20°C.

El paso previo a la realización del western blot es la cuantificación de las proteínas obtenidas, para ello realizamos el método del ácido bicinquinónico, para el cual se pipetea en una placa de 96 pocillos (Falcon) y siempre por duplicado, 5 μ l de un patrón de albúmina en buffer de lisis a concentraciones 0, 0,2, 0,6, 0,8, 1 y 2, y 5 μ l de cada eppendorf donde tenemos congeladas nuestras muestras problema. A cada pocillo se les añade 200 μ l de una solución colorimétrica de sulfato de cobre al 2% en ácido bicinquinónico. Se incuba la placa a 37°C durante 20-25 minutos y se leen las absorbancias a 550nm en un lector de placas (Jupiter de Asyshitech). Por último se realiza la curva patrón y se extrapolan las concentraciones de proteínas que se tienen en cada muestra.

Para el proceso de western blot se desnaturalizan las muestras calentándolas durante 5 minutos a 95°C, y se les añade un 5% de una mezcla de 0,003gr de β -mercaptoetanol/ml de azul de bromofenol. Mientras tanto, se preparan los geles de electroforesis en un sistema Bio-Rad con cristales de 1,5mm de espesor (para cada proteína se realizarán geles a la concentración de acrilamida óptima para su visualización). Primero se realiza el gel de separación de proteínas, se le añade butanol saturado mientras se prepara el gel de concentración, y una vez listo, se elimina el butanol, se lava 3 veces con agua

destilada y se añade el líquido para obtener el gel de concentración al que se le añaden los peines para fabricar los pocillos donde una vez gelificados se procede a limpiar con buffer de corrido y a añadir el volumen necesario para obtener una concentración de proteínas en cada pocillo de 20mg/ml. Previamente a la carga de las muestras, los geles se colocan en la cubeta para la electroforesis y se llena de buffer de corrido. Una vez terminado este proceso se procede a realizar la electroforesis conectando la cubeta a una fuente de alimentación (Amersham) que se deja a 120 mV hasta que se observe que ha terminado el proceso.

El siguiente paso es la transferencia de proteínas de los geles a las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham), por ello se cortan las membranas y se colocan 30 segundos en metanol para activarlas, se lavan 3 veces con agua destilada y por último se colocan 10 minutos en buffer de transferencia. En un sistema de transferencia semiseco (Hoeffer) colocamos los filtros (Immobilon de Millipore) de 0,2 μ m de poro previamente empapados en buffer de transferencia y se colocan encima las membranas, los geles sobre su correspondiente membrana y encima otros filtros. Se cierra el sistema, se le coloca peso encima y se conecta a la fuente de alimentación a 141mA según la fórmula: cm^2 (ancho x largo) x número de membranas x 0,8.

Tras dos horas, una vez terminada la transferencia, se recogen las membranas, se lavan con TBS-t 3 veces 10 minutos y se bloquean con leche en polvo semidesnatada 5% en TBS-t durante una hora y media a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas. Por último en ese día se lavan las membranas con TBS-t y se incuban con el anticuerpo primario (1:1000) en TBS-t + 0,3% de albúmina a 4°C toda la noche. Al día siguiente se quita el anticuerpo primario y se lavan las membranas 3 veces 10 minutos cada y se pone el anticuerpo secundario correspondiente 1:8000, salvo la β -actina que se hizo siempre 1:10000. Por último previo al revelado, se lavan las membranas 6 veces 10 minutos con TBS-t. La inmunoreactividad se determina mediante la incubación de las membranas durante 5 minutos, con ECL prime (Amersham) y se realiza la detección de quimioluminiscencia en un sistema de detección Odyssey FC (LI-COR).

En una misma membrana, una vez determinada la expresión de una proteína, se puede comprobar la expresión de otra. Para ello se debe eliminar el

complejo de unión entre el anticuerpo primario con el secundario y la peroxidasa de rábano necesaria para la quimioluminiscencia. Así, se incuba la membrana en una solución (para 100ml: 20ml SDS 10% + 12,5 ml Tris HCl pH 8,6 0,5M + 0,8 ml β -mercaptoetanol + 65,5 agua destilada) a 50 °C durante 45 minutos en agitación y se lava con TBS-t durante una hora, por último se bloquea la membrana y continua el proceso como se ha explicado previamente. Este proceso se realiza para la detección de la expresión de la proteína fosforilada (P-MYPT1) frente a la no fosforilada MYPT1, en las mismas membranas.

Se utiliza la expresión de β -actina (47 Kd) de músculo liso como proteína constitutiva de referencia para cada membrana.

La cuantificación de las bandas de proteínas obtenidas en la detección se realiza por ordenador mediante densitometría con el programa Image J 1.45s (National Institutes of Health, USA)

4.3 Productos utilizados

4.3.1 Geles

- Concentrador:

CONCENTRADOR	
Vol. Tot. 10ml	4%
DDH₂O	6,10ml
Acrilamida 30%	1,3ml
Tris pH 6,8	2,5ml
SDS 20%	50 μ l
APS 10%	100 μ l
TEMED	20 μ l

- Separador:

SEPARADOR			
Vol. Tot. 40ml	8%	10%	12%
DDH₂O	18,5ml	15,8ml	13,2ml
Acrilamida 30%	10,67ml	13,33ml	16ml
Tris pH 8,8	10ml	10ml	10ml
SDS 20%	200 µl	200 µl	200 µl
APS 10%	400 µl	400 µl	400 µl
TEMED	40µl	40 µl	40 µl

4.3.2 Soluciones

- Solución de colagenasa:

- Antibiótico 50 µl
- Colagenasa 22,5 mg
- Albúmina 10 mg

Enrasar a 5ml con medio RPMI.

- Buffer de lisis:

- Glicerol 50% 10 ml
- SDS 20% 5,75 ml
- Tris 1M pH 6,8 3,125 ml
- EDTA 0,5M 1 ml
- NaCl 5M 1,5 ml

Enrasar a 50ml con agua destilada

- Buffer de transferencia:

- 48 mM TRIS	5.8 gr
- 39 mM Glicina	2.9 gr
- 0.037% SDS	0.37 gr
- 20% Metanol	200 ml

Enrasar a 1 l con agua destilada.

- Buffer de corrido 5x:

- 25 mM TRIS	15.15 gr
- 192 mM Glicina	72 gr
- 0,1 % SDS	5 gr

Enrasar a 1 l con agua destilada, para trabajar se utiliza a 1x, para ello se cogen 200ml de 5x y se enrasa a 1 l con agua destilada.

- TBS 10x:

- 25 mM TRIS	39.20 gr
- 75mM NaCl	43.80 gr

Enrasar con 1 l de agua destilada.

Para obtener TBS-tween 1x, se cogen 100ml de TBS 10x, se le añade 1ml de Tween 20 y se enrasa a 1 l con agua destilada, por último se debe ajustar el pH a 7.4

4.3.4 Reactivos

- RPMI 1640 (Life Technologies)
- Antibiótico antimetabólico (Life Technologies)
- L-Glutamina (Sigma- Aldrich)

- Suero fetal bovino (Life Technologies)
- Colagenasa (Sigma- Aldrich)
- Albúmina (Sigma- Aldrich)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Panreac)
- Tripsina (Life Technologies)
- Fenilefrina (Sigma- Aldrich)
- HA-1077 (Sigma- Aldrich)
- Buffer Salino Fosfato (PBS) (Sigma- Aldrich)
- Glicerol (Sigma- Aldrich)
- Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma- Aldrich)
- Trizma base (Tris) (Sigma- Aldrich)
- EDTA (ácido etilendiaminotetracético) (Sigma- Aldrich)
- Cloruro sódico (Panreac)
- Sulfato de cobre (Sigma- Aldrich)
- Ácido Bicinquiónico (Sigma- Aldrich)
- β -mercaptoetanol (Sigma- Aldrich)
- Azul de bromofenol (Sigma- Aldrich)
- Acrilamida 30% (Sigma- Aldrich)
- Amonio persulfato (APS) (Sigma- Aldrich)
- N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina (TEMED) (Sigma- Aldrich)
- 1-Butanol (Panreac)
- Glicina (Sigma- Aldrich)
- Metanol (Panreac)
- Tween-20 (Sigma- Aldrich)
- Anticuerpo de conejo contra P-MYPT1 (Thr 853) (Cell Signaling)
- Anticuerpo de conejo contra MYPT1 (Cell Signaling)
- Anticuerpo de conejo contra RhoA (67B9) (Cell Signaling)
- Anticuerpo de conejo contra Rhock I (C8F7) (Cell Signaling)
- Anticuerpo de conejo contra Rock II (Cell Signaling)
- Anticuerpo de ratón contra β -actina (Sigma- Aldrich)
- Anticuerpo de peroxidasa de rábano contra ratón IgG (Promega)
- Anticuerpo de peroxidasa de rábano contra conejo IgG (Promega)

4.4 Análisis de los resultados

Para cada proteína se realiza una relación de ésta frente al control de carga β -actina, obteniéndose así un valor numérico de relación.

En el caso de RhoA y ROCK I y II, se muestra una representación de los valores de proteína para cada edad como medias y errores estándar de la media. Para RhoA se realiza un test no paramétrico (por falta de valores no se pudo realizar test de normalidad) de Kruskal-Wallis con *post test* de Dunn para comparar valores entre pacientes.

Para el análisis de la fosforilación de la proteína MYPT1, la relación de PMYPT1 frente a β -actina, se enfrenta a la relación de la proteína MYPT1 sin fosforilar frente a β -actina, obteniendo un valor numérico de las dos relaciones enfrentadas.

Para comprobar si existe una diferencia en la cantidad de fosforilación de la proteína MYPT1 frente a la proteína sin fosforilar entre pacientes según su edad, se muestra una representación de los valores totales de la proteína PMYPT1 frente a MYPT1 para cada edad, como medias y errores estándar de la media, y se realiza un test de Kruskal-Wallis (los datos no presentaban normalidad al hacer el test de D'Agostino Pearson) con *post test* de Dunn para comparar valores entre pacientes.

Por último, para cada paciente según su edad y para todos los pacientes como un conjunto, se realiza una representación gráfica de barras, situando a distintos tiempos (0, 7, 15, 30, 60, 300 segundos) los valores de la relación PMYPT1 frente a MYPT1, como media de los valores y su error estándar de la media de la cantidad de fosforilación producida por phe 10 μ M frente a la producida por phe 10 μ M + HA 50 μ M. Se realiza un test de Kruskal-Wallis (los datos no presentaron normalidad al hacer un test de D'Agostino Pearson, o por falta de valores no se pudo realizar) con *post test* de Dunn comparando los tiempos con el tiempo control para saber si la fosforilación se produce en o a partir de algún tiempo específico. Además se realiza para cada paciente según su edad e igualmente para todos los pacientes como un conjunto, un test ANOVA de dos vías pareado, en el que se comparan la relación PMYPT1/MYPT1 entre tiempos para phe y phe+HA y posteriormente se realiza un test no paramétrico para muestras pareadas o test de Friedman donde se

muestra el efecto de la inhibición de la fosforilación de phe+HA frente a phe, para cada tiempo.

En todos los tests se utiliza el P valor < 0,05 como estadísticamente significativo. Las gráficas y los análisis se realizan con el programa estadístico GraphPad Prism 5.

IV. Resultados

1. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

Se ha estudiado el mecanismo contráctil inducido por 10 μ M del agonista fenilefrina (phe) en arterias mesentéricas humanas, para ello utilizamos distintos fármacos (nifedipina, KBR, SKF, HA, 2-APB y CPA) que nos ofrecen varias posibilidades para descifrar dicho mecanismo. Además comprobaremos si existen diferencias entre 3 grupos de edad: jóvenes (17-40), adultos (41-65), y ancianos (66-83); y frente al género y hábitos o enfermedades que presentaban los pacientes de donde provenían las muestras.

Para estos estudios se han utilizado muestras de 41 pacientes, con un número total de anillos de n=174.

Px	SEXO	EDAD	DIAB	FUM	HPC	HPT	OB	SDNT	NEOPL
1	M	17							
2	F	18				x	x	x	
3	M	20		x					
4	M	25		x		x	x	x	
5	M	25							
6	M	26							
7	M	28		x	x		x	x	
8	F	34		x			x		
9	M	35							
10	F	35					x	x	
11	F	36							
12	F	43					x	x	x
13	M	47		x	x	x	x	x	
14	M	48			x		x	x	
15	F	48			x	x	x	x	
16	M	52		x	x				
17	M	52		x	x				
18	M	54		x					x
19	F	54	x			x	x	x	
20	M	54		x					x
21	M	57	x	ex		x	x	x	
22	M	58		x					x
23	F	59					x	x	
24	M	61							x
25	F	63	x	ex				x	x
26	M	64			x			x	
27	M	69		ex	x				x
28	M	69		x	x	x	x	x	x
29	M	69						x	x

30	M	70							x
31	M	71		x	x	x		x	x
32	M	76			x	x			x
33	M	76				x			x
34	M	76	x	ex	x	x	x		x
35	F	77				x		x	x
36	F	79	x			x		x	x
37	M	79				x			x
38	M	79		ex		x			x
39	F	80			x	x		x	x
40	F	83			x	x	x	x	x
41	M	83				x			x

Tabla 1: características de los pacientes cuyas muestras se utilizaron para estos experimentos. Por orden, las características son: sexo, edad, diabetes, fumador, hipercolesterolemia, hipertensión, obesidad, sedentarismo y neoplasia. La x en la casilla indica que el paciente presentaba alguna de esas características.

1.1 Efecto de 2-APB

El fármaco 2-APB es un bloqueante de los canales IP_3 . Se observa que existe un menor bloqueo en los grupos de edad de adultos y ancianos frente a jóvenes, produciéndose un menor porcentaje de relajación arterial según se avanza en la edad, debido a que la cantidad de Ca^{2+} procedente del RS que se libera a través de estos canales es menor y por tanto se mantiene parte de la contracción por otras vías. Al realizar el análisis estadístico, éste muestra un $p=0,0428$, siendo así el análisis significativo, debido a la diferencia entre jóvenes y ancianos, figura 9.

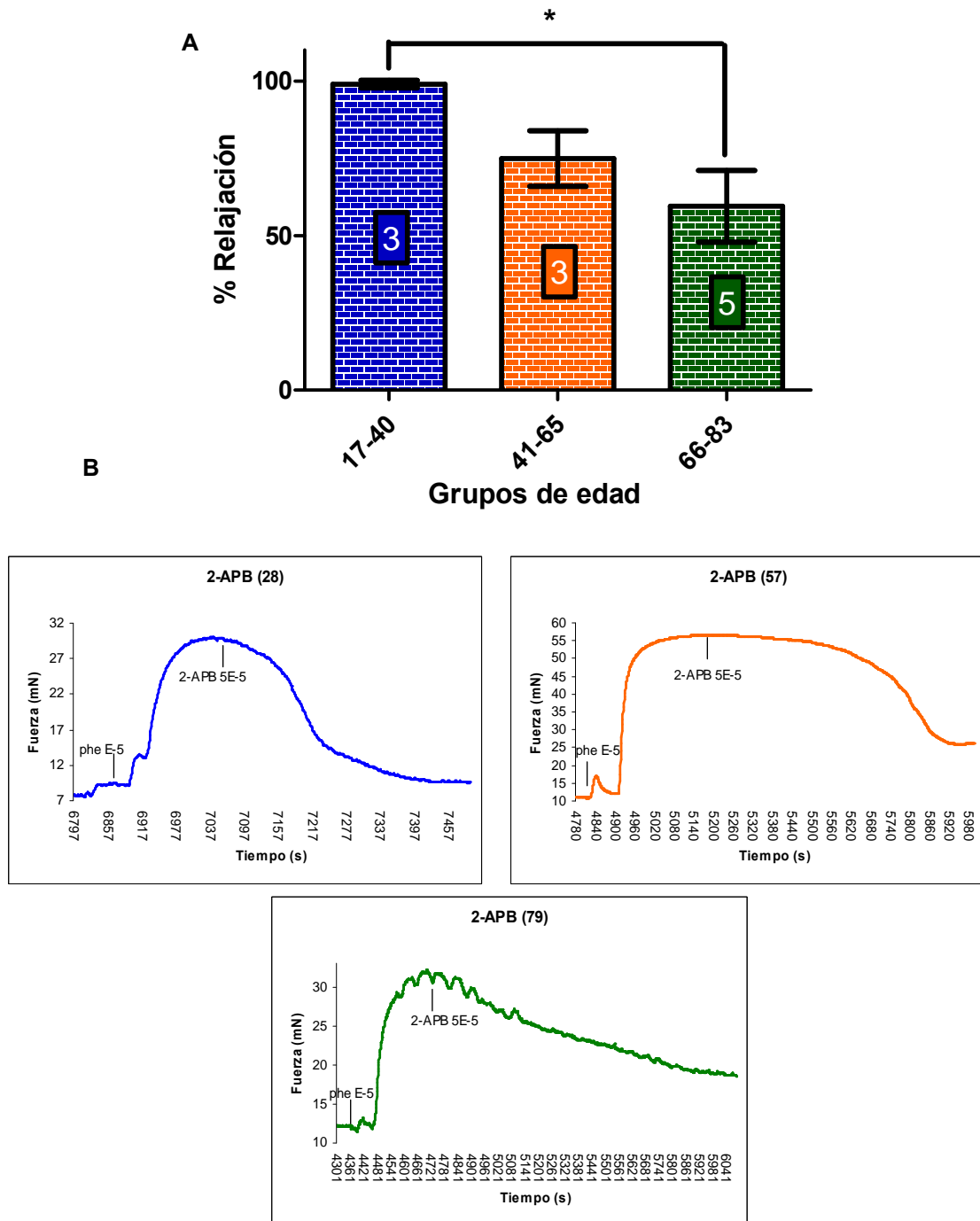


Figura 9: A. Gráfica de barras del % de relajación de las medias y los errores estándar de la media de tres grupos de edad para 2-APB. * = diferencia significativa $p < 0,05$ entre grupos, el número dentro de cada barra son los anillos utilizados. B. Ejemplos experimentales de un paciente (edad entre paréntesis) de cada grupo con % de relajación cercano a la media de su grupo.

1.2 Efecto de CPA

CPA es un inhibidor de la bomba SERCA. Se observa que la inhibición que produce CPA es similar en jóvenes y ancianos aunque hay que tener en cuenta los amplios errores estándar que presentan, mientras que en adultos disminuye claramente. No existen diferencias significativas en cuanto al efecto producido entre los grupos de edad. El efecto de CPA en adultos indica que para este grupo de edad (41-65) inhibir SERCA no produce un efecto vasodilatador importante ($23,11 \pm 5,19\%$), mientras que en los otros grupos de edad la diferencia entre valores dentro del mismo grupo fue muy amplia ($61,16 \pm 23,61$, en jóvenes y $57,25 \pm 20,55$ para ancianos), lo que no nos permite realizar una correcta valoración, figuras 10 y 11.

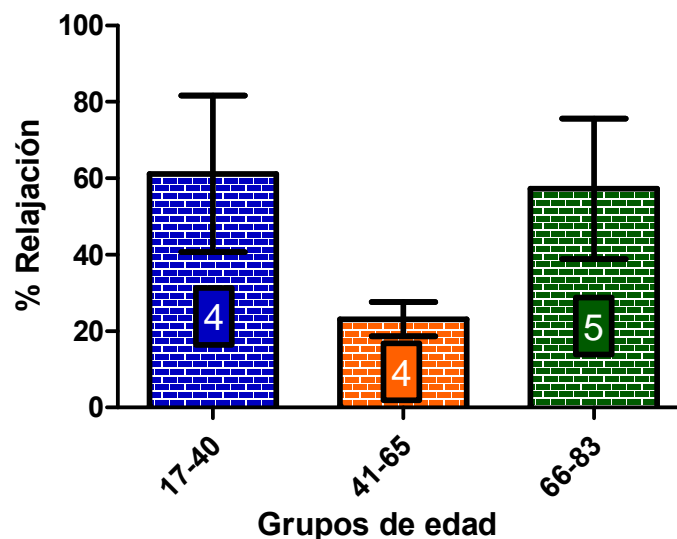


Figura 10: gráfica de barras del % de relajación de las medias y los errores estándar de la media de tres grupos de edad para CPA. El número dentro de cada barra son los anillos utilizados.

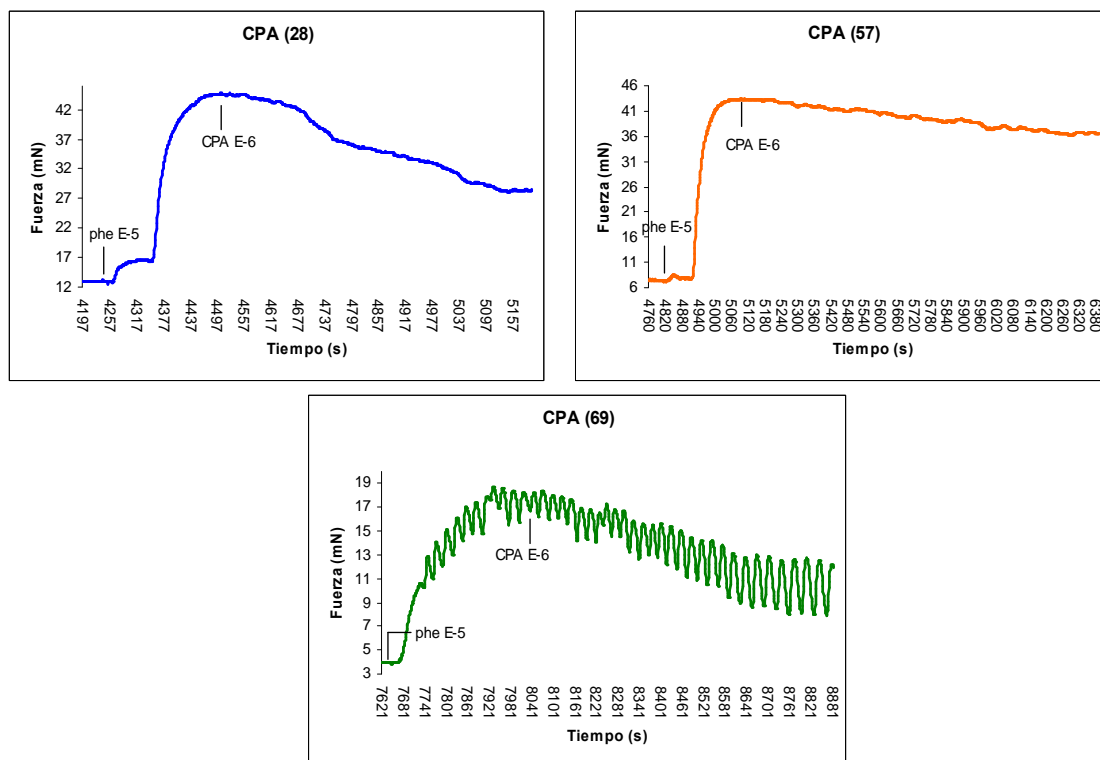


Figura 11: ejemplos experimentales de un paciente (edad entre paréntesis) de cada grupo de edad con % de relajación cercano a la media del grupo al que pertenece.

1.3 Efecto de HA

Este inhibidor de la Rho kinasa produce un efecto vasodilatador prácticamente completo en los tres grupos de edad estudiados, con lo que se presenta como el fármaco vasodilatador más efectivo de los que se han utilizado en la presente tesis doctoral. No presenta diferencias significativas en cuanto al porcentaje de relajación producido en cada grupo de edad, figura 12.

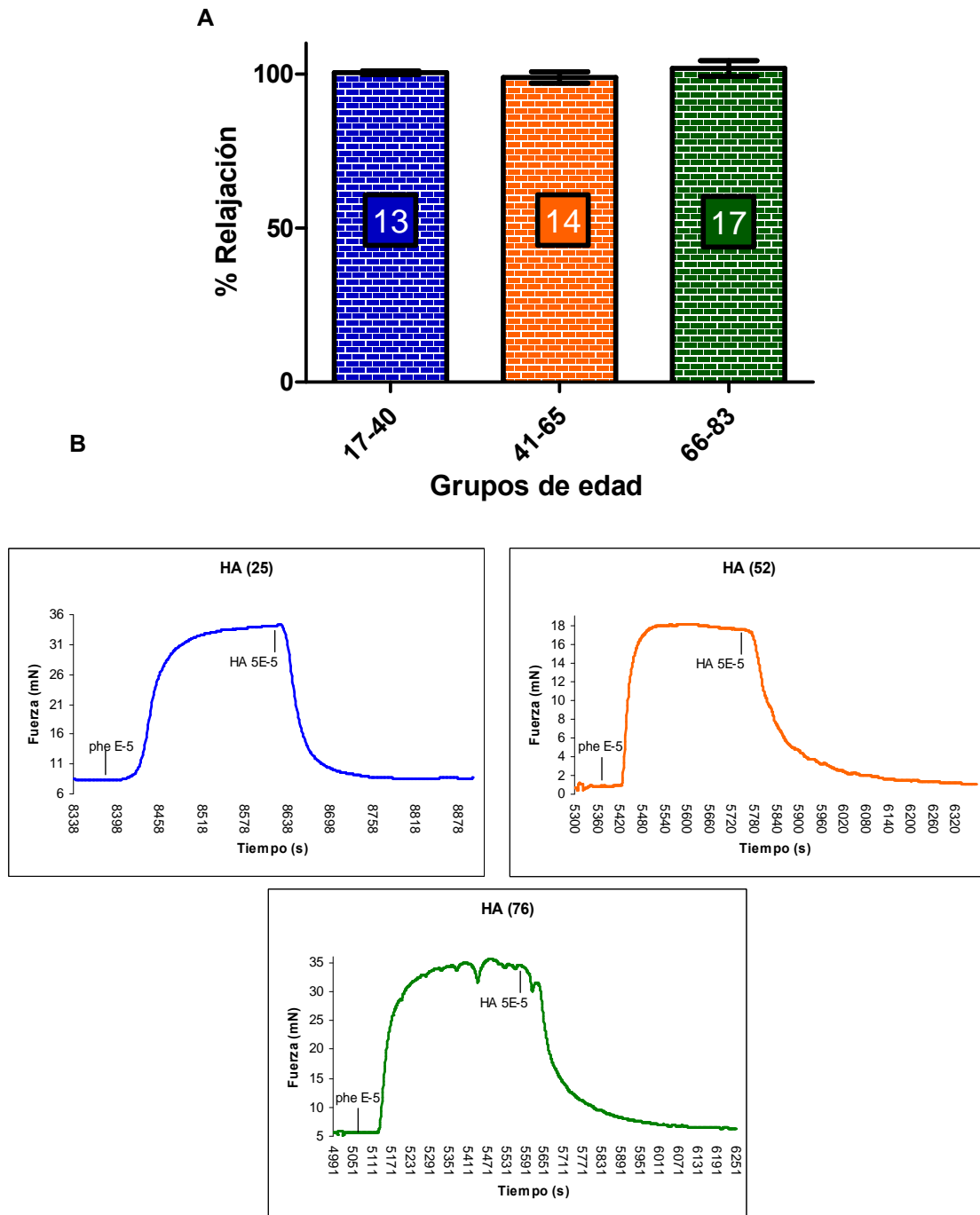


Figura 12: A. Gráfica de barras del % de relajación de las medias y los errores estándar de la media de tres grupos de edad para HA. El número dentro de cada barra son los anillos utilizados. B. Ejemplos experimentales de un paciente (edad entre paréntesis) de cada grupo de edad con % de relajación cercano a la media del grupo al que pertenece.

1.4 Efecto de KBR

El fármaco KBR presenta la capacidad de inhibir el modo reverso de la bomba de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Se puede observar que produce un efecto vasodilatador que va reduciéndose según se avanza en los grupos de edad, produciendo alrededor de un 80% de relajación en el grupo de jóvenes, un 62% en el de adultos y un 35% en el de ancianos. Con lo que la mayor inhibición del modo reverso de la bomba de intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en jóvenes indica que este mecanismo de entrada de Ca^{2+} es mas abundante en este grupo que en los otros dos, y mucho menor en el de ancianos. El análisis estadístico indica un $p=0,0032$, siendo muy significativa la diferencia entre los grupos de jóvenes y ancianos, figuras 13 y 14.

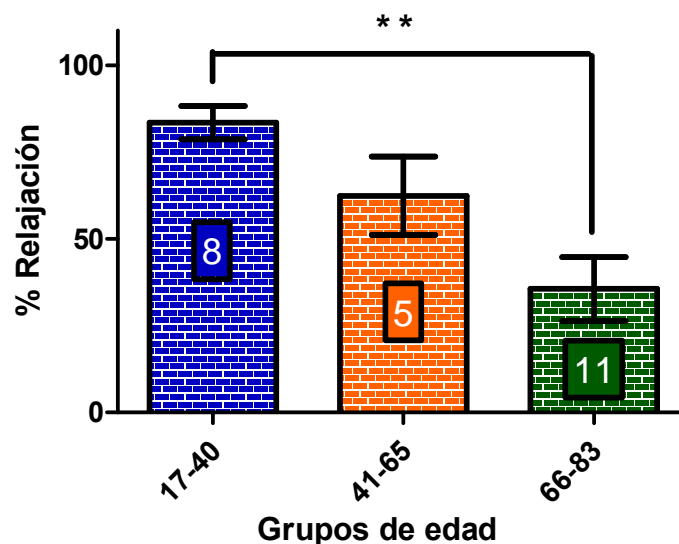


Figura 13: gráfica de barras del % de relajación de las medias y los errores estándar de la media de tres grupos de edad para KBR. ** = diferencia muy significativa $p < 0,01$ entre grupos. El número dentro de cada barra son los anillos utilizados.

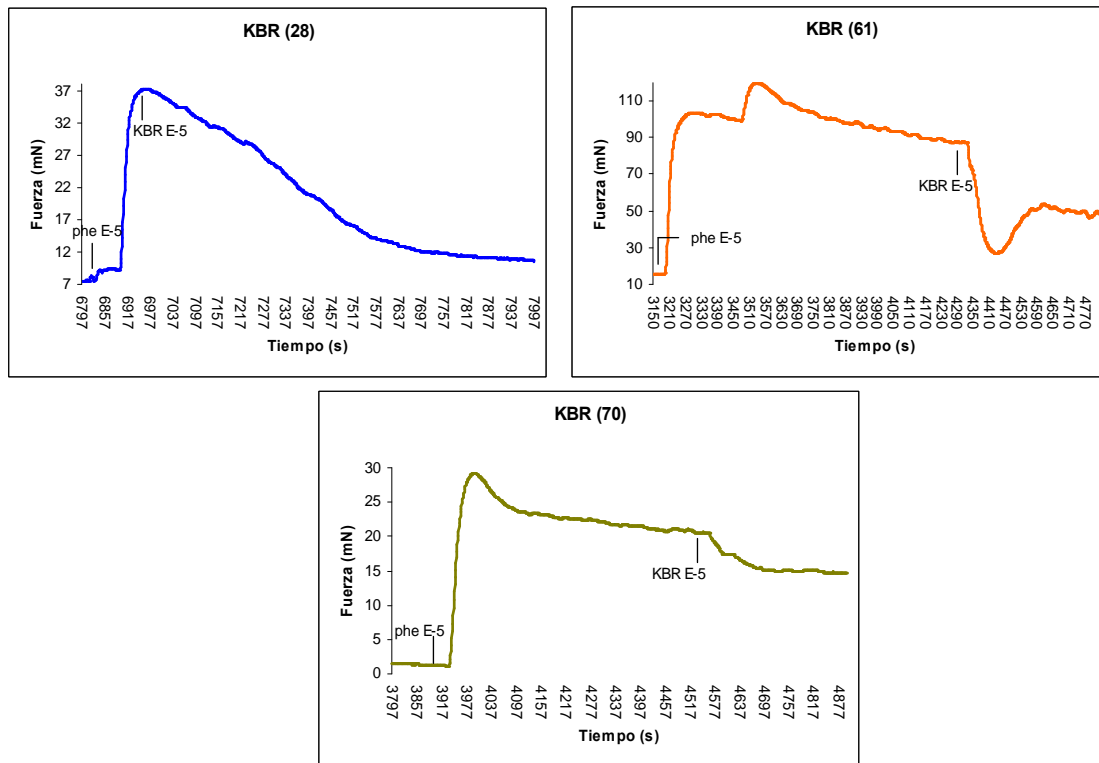


Figura 14: ejemplos experimentales de un paciente (edad entre paréntesis) de cada grupo de edad con % de relajación cercano a la media del grupo al que pertenece.

1.5 Efecto de Nifedipina

La nifedipina es un bloqueante de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L. Se observa que la relajación que produce en cada grupo de edad descende en un 10% según avanzamos en la edad de los grupos. Así, los jóvenes dependen en mayor medida de la entrada de Ca^{2+} extracelular para el mantenimiento de la contracción frente a los adultos y los ancianos. El estadístico $p=0,0225$ siendo significativa la diferencia en el % de relajación entre jóvenes y ancianos, figura 15.

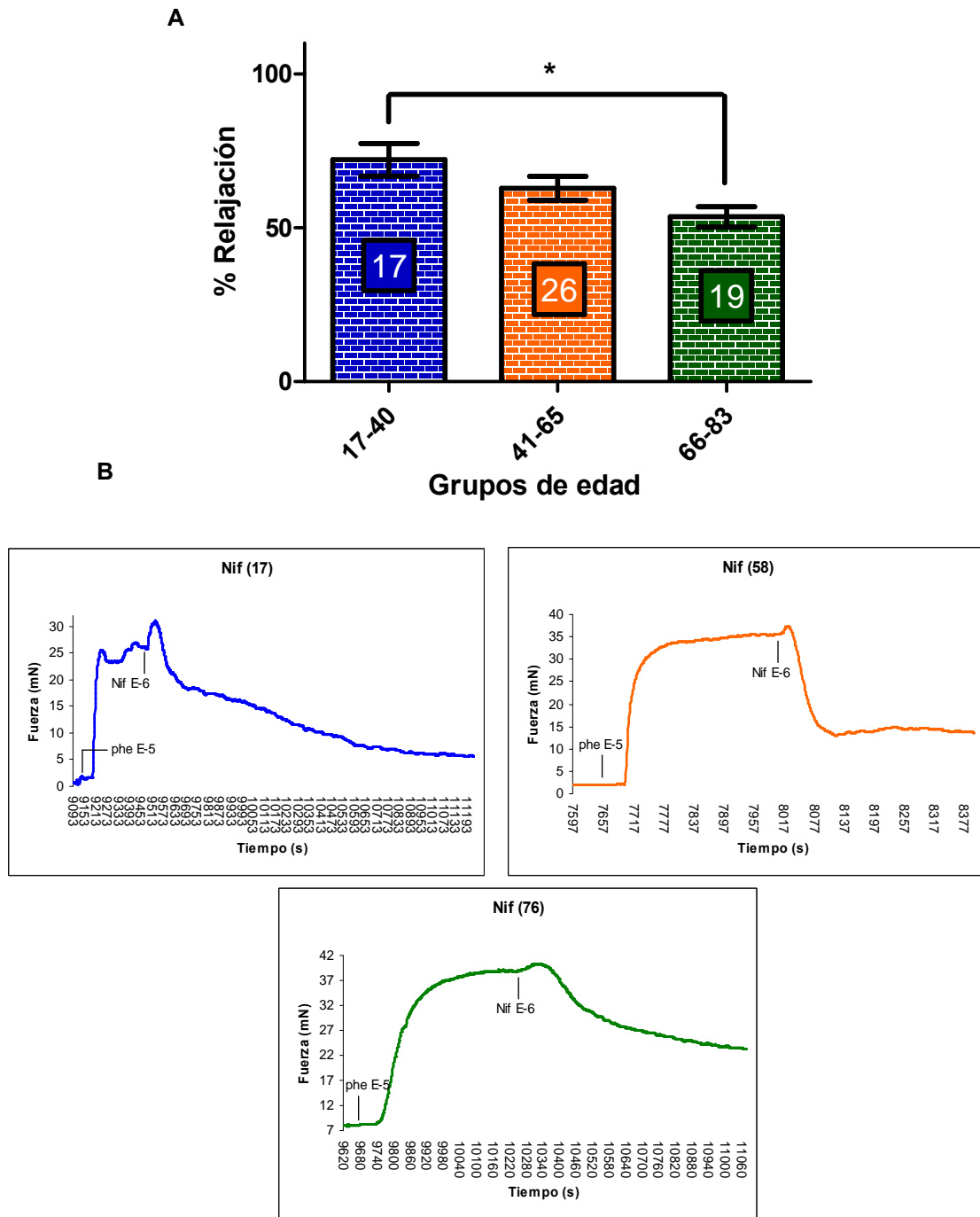


Figura 15: A. Gráfica de barras del % de relajación de las medias y los errores estándar de la media de tres grupos de edad para Nif. * = diferencia significativa $p < 0,05$ entre grupos, el número dentro de cada barra son los anillos utilizados. B. Ejemplos experimentales de un paciente (edad entre paréntesis) de cada grupo de edad con % de relajación cercano a la media del grupo al que pertenece.

1.6 Efecto de SKF

SKF es un bloqueante de los canales operados por receptor y por liberación de calcio desde orgánulos de almacenamiento. Se puede observar que estos canales ejercen la misma función independientemente de la edad, debido a que su bloqueo por medio de SKF no se ve reducido, siendo en todos los grupos aproximadamente de un 100%, por lo tanto no presentan diferencias significativas entre los distintos grupos de edad, figuras 16 y 17.

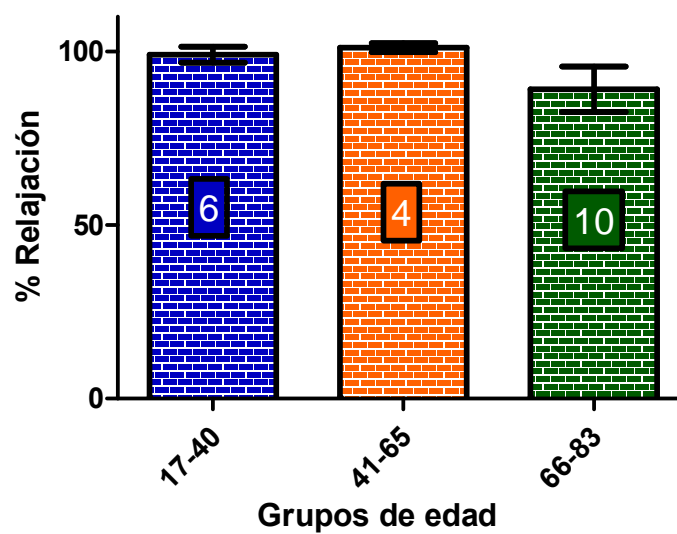


Figura 16: gráfica de barras del % de relajación de las medias y los errores estándar de la media de tres grupos de edad para SKF. El número dentro de cada barra son los anillos utilizados.

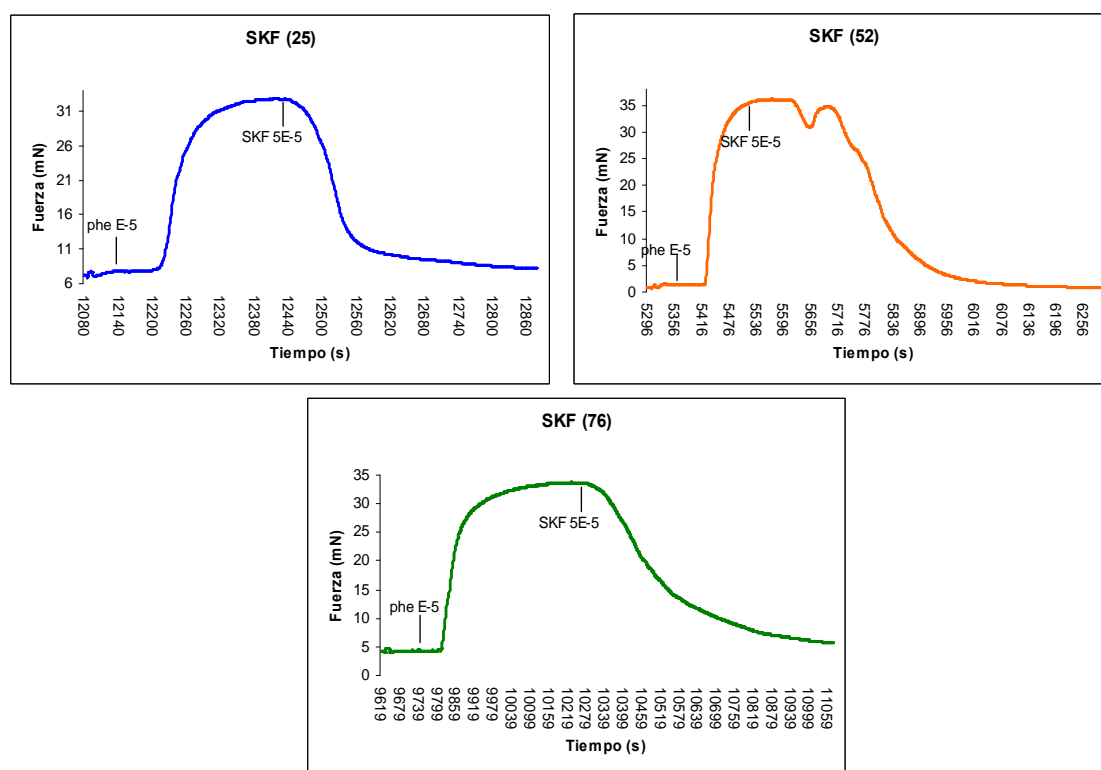


Figura 17: ejemplos experimentales de un paciente (edad entre paréntesis) de cada grupo de edad con % de relajación cercano a la media del grupo al que pertenece.

1.7 Posibles efectos de los vasodilatadores según sexo y enfermedades de los pacientes

Los valores mostrados en la tabla 2 indican el porcentaje de relajación para cada uno de los vasodilatadores utilizados en el apartado 1. Además de los porcentajes de relajación para cada vasodilatador, que se podrían producir en un paciente, según el grupo de edad al que pertenezca y según una única característica (edad, género, diabetes, sedentarismo, etc...). Debido a los elevados valores de error estándar que presentan la mayoría de las medias de valores, y a que existen características sin valores o con solo uno, resulta complicado hacer una valoración certera de las diferencias en el género, los hábitos o patologías definidas, aunque se pueden observar ciertas tendencias.

IV. Resultados

Tx	Grupo	MEDIA		FUMADOR					
			n	S	n	N	n	Ex	n
2APB	17-40	98,98±1,51	3	96,77±0	1	100,08±1,36	2	-	0
	41-65	74,94±10,96	3	-	0	76,55±21,57	2	71,72±0	1
	66-83	59,51±12,98	5	78,44±0	1	48,34±25,28	2	61,21±38,01	2
CPA	17-40	61,16±23,61	4	29,6±32,11	2	92,72±1,77	2	-	0
	41-65	23,11±5,19	4	-	0	24,7±10,29	3	18,34±0	1
	66-83	57,25±20,55	5	92,86±0	1	58,9±59,04	2	37,81±35,19	2
HA	17-40	100,39±0,61	13	99,37±1,2	5	101,02±2,38	8	-	0
	41-65	98,85±1,92	14	102,31±8,98	4	95,25±5,59	7	102,63±2,61	3
	66-83	101,78±2,59	17	95,83±4,83	3	102,73±11,71	9	99,51±5,78	4
KBR	17-40	83,46±5,07	8	88,04±1,89	2	81,93±15,49	6	-	0
	41-65	62,39±12,66	5	63,84±35,17	3	60,2±8,68	2	-	0
	66-83	35,6±9,66	11	-	0	35,14±35,78	7	30,91±36,19	2
NIF	17-40	72,09±5,45	17	81,56±24,06	6	66,92±19,69	11	-	0
	41-65	62,85±3,89	26	59,77±18,06	13	67,97±19,73	10	59,09±28,34	3
	66-83	53,55±3,41	19	70,7±0	1	56,95±11,99	12	37,43±13,4	4
SKF	17-40	99,03±2,53	6	97,02±4,41	2	100,03±6,55	4	-	0
	41-65	101,06±1,45	4	101,38±0,43	2	100,75±4,28	2	-	0
	66-83	89,07±6,91	10	-	0	93,09±23,42	7	75,93±10,56	2

Tx	Grupo	SEXO				DIABETES			
		M	n	F	n	S	n	N	n
2APB	17-40	98,98±2,14	3	-	0	-	0	98,98±2,14	3
	41-65	71,72±0	1	76,55±21,57	2	71,72±0	1	76,55±21,57	2
	66-83	57,83±29,67	4	66,22±0	1	50,28±22,54	2	83,26±6,82	2
CPA	17-40	61,16±40,9	4	-	0	-	0	61,16±40,9	4
	41-65	18,34±0	1	24,7±10,29	3	18,34±0	1	24,7±10,29	3
	66-83	57,25±41,09	5	-	0	12,92±0	1	85,4±20,05	3
HA	17-40	100,32±1,79	10	100,61±3,5	3	-	0	100,39±2,12	13
	41-65	101,06±7,33	6	97,18±6,6	8	101,97±2,51	4	97,6±7,82	10
	66-83	102,73±10,55	15	94,61±6,43	2	94,93±4,55	4	106,15±9,78	11
KBR	17-40	90,93±4,08	5	71,02±15	3	-	0	83,46±13,41	8
	41-65	61,4±29,13	4	66,34±0	1	-	0	62,39±25,32	5
	66-83	45,57±29,64	8	9,02±11,51	3	3,21±2,99	2	51,04±27,1	7
NIF	17-40	80,09±15,67	12	52,87±23,9	5	-	0	72,09±21,8	17
	41-65	60,51±19,85	18	68,1±18,67	8	58,17±23,21	4	63,7±19,19	22
	66-83	49,15±14,68	13	63,07±8,86	6	58,39±18,66	4	51,79±15,39	10
SKF	17-40	100,05±5,67	5	93,9±0	1	-	0	99,03±5,66	6
	41-65	101,38±0,43	2	100,75±4,28	2	-	0	101,06±2,51	4
	66-83	80,25±22,98	6	102,3±4,4	4	91,47±11,41	2	81,02±26,8	5

Tabla 2: continúa en la siguiente hoja.

Tx	Grupo	HIPERTENSIÓN				OBESIDAD			
		S	n	N	n	S	n	N	n
2APB	17-40	-	0	98,98±2,14	3	96,77±0	1	100,08±1,36	2
	41-65	81,76±14,2	2	61,3±0	1	74,94±15,5	3	-	0
	66-83	52,37±23,64	4	88,09±0	1	34,34±0	1	65,8±25,2	4
CPA	17-40	6,89±0	1	79,25±23,37	3	29,6±32,11	2	92,72±1,77	2
	41-65	15,88±3,47	2	30,33±4,62	2	23,11±8,98	4	-	0
	66-83	55,89±47,32	4	62,69±0	1	12,92±0	1	68,34±37,85	4
HA	17-40	100,9±2,72	4	100,16±1,93	9	100,08±2,23	7	100,74±2,12	6
	41-65	96,82±6,81	5	99,97±7,13	9	96,24±5,63	8	102,32±7,43	6
	66-83	100,3±9,75	15	112,91±10,27	2	94,14±2,91	4	104,13±10,75	13
KBR	17-40	-	0	83,46±13,41	8	81,87±10,77	3	84,41±15,93	5
	41-65	-	0	62,39±25,32	5	66,34±0	1	61,4±29,13	4
	66-83	28,01±29,91	8	55,84±26,23	3	5,32±0	1	38,63±30,4	10
NIF	17-40	78,39±27,87	4	70,15±20,54	13	70,8±27,2	9	73,54±15,35	8
	41-65	81,01±13,13	6	57,4±17,8	20	76,33±18,09	11	52,96±13,92	15
	66-83	54,68±14,07	16	47,53±18,34	3	50,76±13,45	4	54,29±15,1	15
SKF	17-40	-	0	99,03±5,66	6	97,02±4,41	2	100,03±6,55	4
	41-65	97,72±0	1	102,18±1,42	3	100,75±4,28	2	101,38±0,43	2
	66-83	89,27±21,96	9	87,24±0	1	83,4±0	1	89,7±21,87	9

Tx	Grupo	HIPERCOLESTEROLEMIA				SEDENTARISMO			
		S	n	N	n	S	n	N	n
2APB	17-40	96,77±0	1	100,08±1,36	2	96,77±0	1	100,08±1,36	2
	41-65	91,8±0	1	61,3±0	1	74,94±15,5	3	-	0
	66-83	66,95±28,66	3	48,34±25,28	2	72,33±8,64	2	50,96±32,21	3
CPA	17-40	52,31±0	1	92,72±1,77	2	29,6±32,11	2	92,72±1,77	2
	41-65	13,43±0	1	30,33±4,62	2	23,11±8,98	4	-	0
	66-83	67,28±39,76	4	17,15±0	1	92,86±0	1	48,35±41,51	4
HA	17-40	99,43±0,23	2	100,7±2,43	9	100,41±2,25	6	100,74±2,12	6
	41-65	95,76±5,64	6	101,25±7,8	7	97,62±5,64	11	103,35±10,7	3
	66-83	97,73±5,17	7	104,61±12,3	10	95,34±4,74	5	103,03±10,31	11
KBR	17-40	89,38±0	1	82,62±14,26	7	79,46±14,03	2	84,41±15,93	5
	41-65	84,6±0	1	56,83±25,48	4	66,34±0	1	61,4±29,13	4
	66-83	4,54±1,11	2	37,36±26,88	8	27,69±38,5	4	39,4±32,66	5
NIF	17-40	94,57±2,45	2	65,59±20,92	13	75,49±24,89	8	73,54±15,35	8
	41-65	67,68±21,33	11	56,99±16,03	14	68,42±20,59	15	59,12±18,42	7
	66-83	52,1±15,03	8	54,6±14,71	11	64,16±8,58	7	45,48±13,79	10
SKF	17-40	100,13±0	1	98,8±6,3	5	100,13±0	1	100,03±6,55	4
	41-65	99,4±2,37	2	102,73±1,48	2	100,75±4,28	2	101,38±0,43	2
	66-83	97,19±12,82	3	85,59±23,28	7	102,3±4,4	4	78,86±25,4	5

Tabla 2: continúa en la siguiente hoja.

Tx	Grupo	NEOPLASIA			
		S	n	N	n
2APB	17-40	-	0	98,98±2,14	3
	41-65	-	0	74,94±15,5	3
	66-83	59,51±25,97	5	-	0
CPA	17-40	-	0	61,16±40,9	4
	41-65	33,6±0	1	19,61±6,9	3
	66-83	57,25±41,09	5	-	0
HA	17-40	-	0	100,39±2,12	13
	41-65	103,39±10,29	4	97,03±4,61	10
	66-83	101,78±10,36	17	-	0
KBR	17-40	-	0	83,46±13,41	8
	41-65	53,67±30,23	3	75,47±12,92	2
	66-83	35,6±30,54	11	-	0
NIF	17-40	-	0	72,09±21,8	17
	41-65	52,66±13,69	11	70,32±20	15
	66-83	53,55±14,48	19	-	0
SKF	17-40	-	0	99,03±5,66	6
	41-65	101,68±0	1	100,86±3,03	3
	66-83	89,07±20,72	10	-	0

Tabla 2: se muestra la media de los % de relajación con respecto al sexo y a las enfermedades que los pacientes puedan padecer, para cada vasodilatador, según los grupos de edad planteados anteriormente. Donde n es el número de pacientes que poseen dichas características.

2. ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL CON REACTIVIDAD VASCULAR

En estos experimentos se estudió, el papel del Ca^{2+} en el mecanismo de acción de la contractilidad vascular. Para ello, se toman medidas de contractilidad vascular a la vez que mediciones de la fluorescencia emitida por el Ca^{2+} tras precontracción con phe $10\mu\text{M}$. Se caracteriza el mecanismo de acción por medio de la adición de 4 tipos de fármacos, CPA, 2-APB, nifedipina y HA.

Contamos con un número de anillos vasculares de $n=14$, provenientes de 7 pacientes distintos.

Px	SEXO	EDAD	DIAB	FUM	HPC	HPT	OB	SDNT	NEOPL
1	F	62		x				x	x
2	M	26							
3	M	62	?	x		x			x
4	F	43							
5	F	71	x			x			x
6	F	68					x	x	x
7	M	69		x			x	x	x

Tabla 3: características de los pacientes cuyas muestras se utilizaron para estos experimentos. Por orden, las características son: sexo, edad, diabetes, fumador, hipercolesterolemia, hipertensión, obesidad, sedentarismo y neoplasia. La x en la casilla indica que el paciente presentaba alguna de esas características.

2.1 Efecto de 2-APB

Se puede observar en este experimento como phe induce una contracción que va precedida por un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, produciendo 3 picos, que posteriormente decae para comenzar con oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ sobre la $[Ca^{2+}]_i$ basal. Una vez se añade el 2-APB comienza a disminuir lentamente la contracción, y la amplitud y frecuencia de las oscilaciones se reducen, llegando casi a desaparecer. La $[Ca^{2+}]_i$ llega a descender por debajo incluso del nivel basal inicial, figura 18.

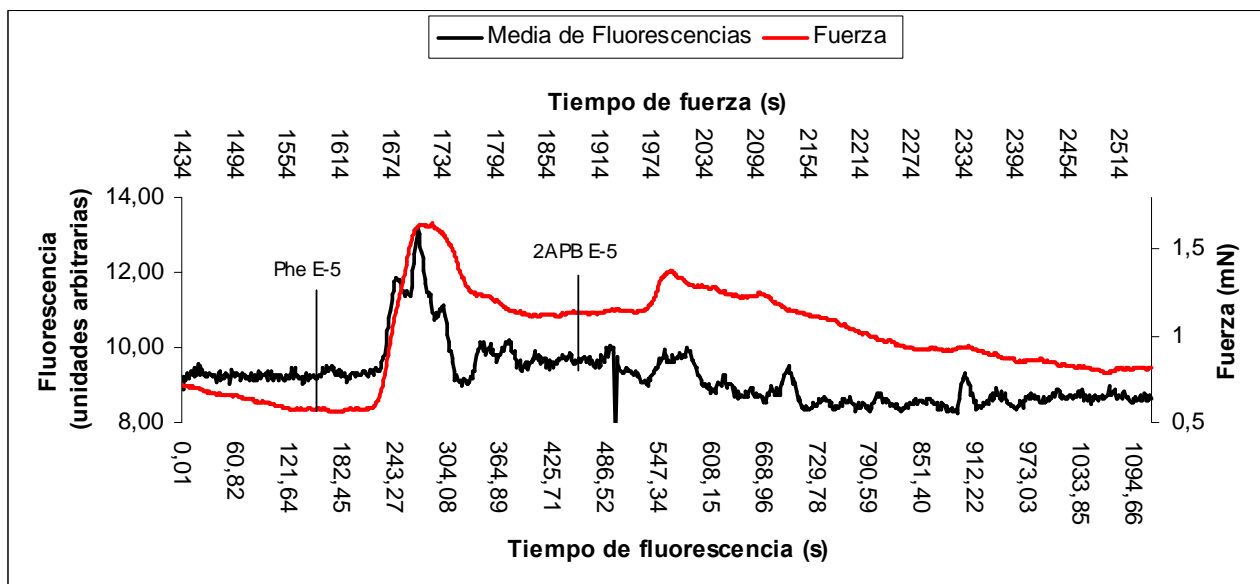


Figura 18: gráfica experimental que muestra la fuerza producida por la arteria y la media de fluorescencia de las 5 células de la figura 19, inducida por phe, a lo largo del tiempo, y los efectos de 2-APB sobre ambas.

Las oscilaciones observadas en cada una de las células seleccionadas individualmente se presentan como sincrónicas entre células, aunque pueden presentar variaciones en oscilaciones individuales o en amplitud y frecuencia en algunos momentos, e incluso estar desplazadas ligeramente en el tiempo, como consecuencia del paso de la onda de Ca^{2+} a través de la arteria pasando por distintas células en momentos distintos, figuras 19 y 20.

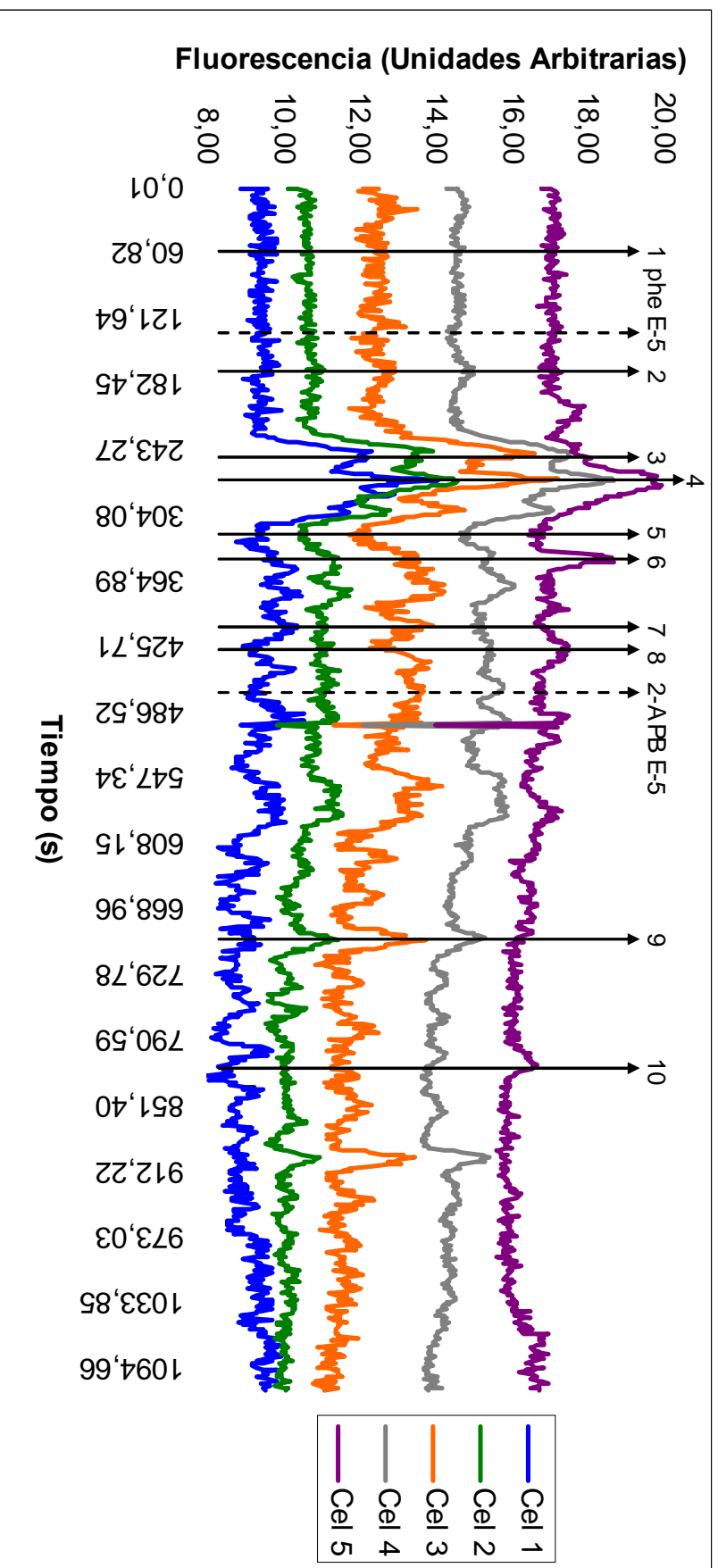
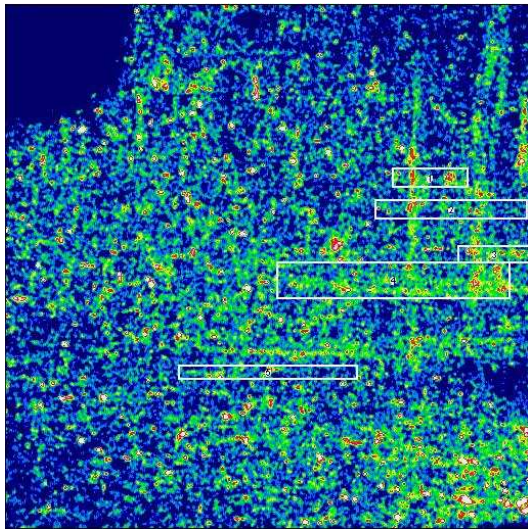
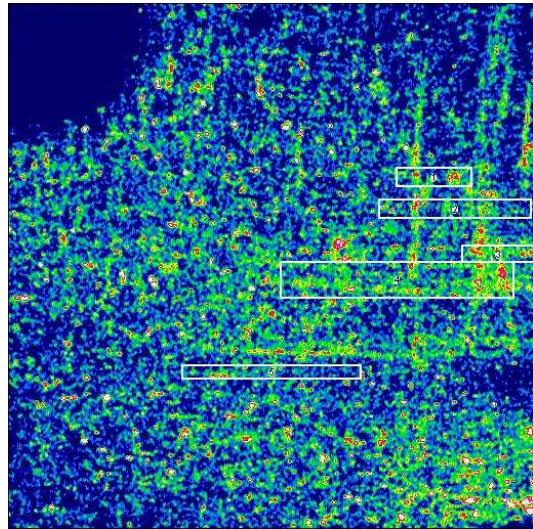


Figura 19: representación gráfica proveniente del video de microscopía confocal, de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ producidas por phe, en 5 células distintas en el tiempo, y el efecto de 2-APB en ella. Los números representan tiempos seleccionados en la imagen que se muestran como fotografías a continuación.

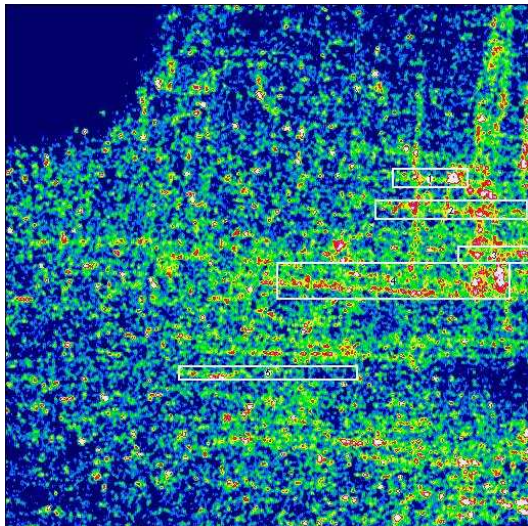
1



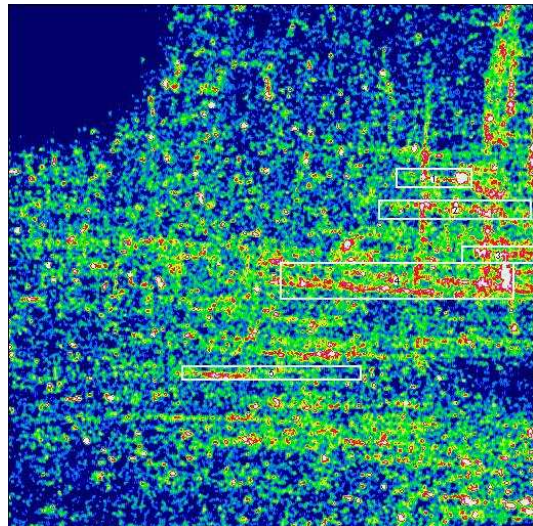
2



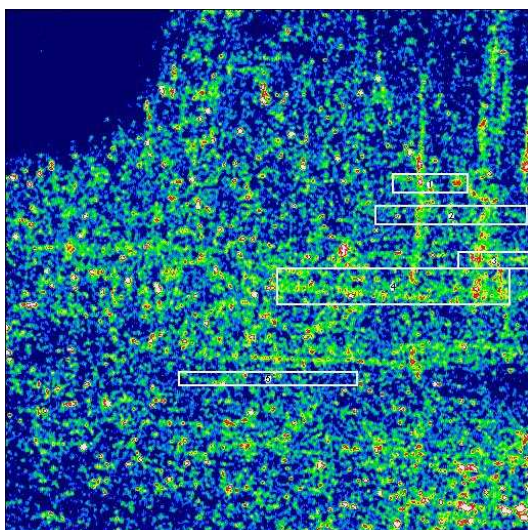
3



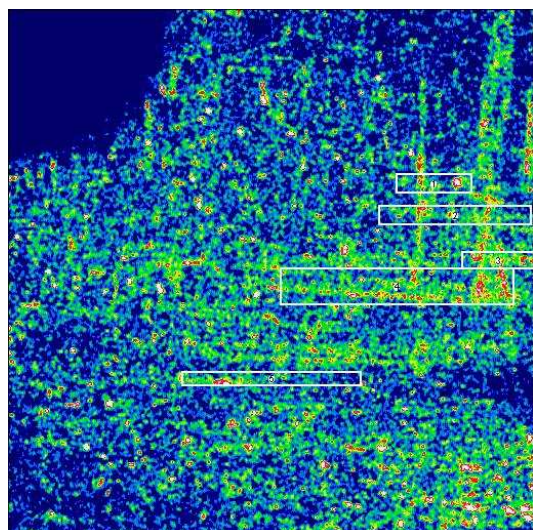
4



5



6



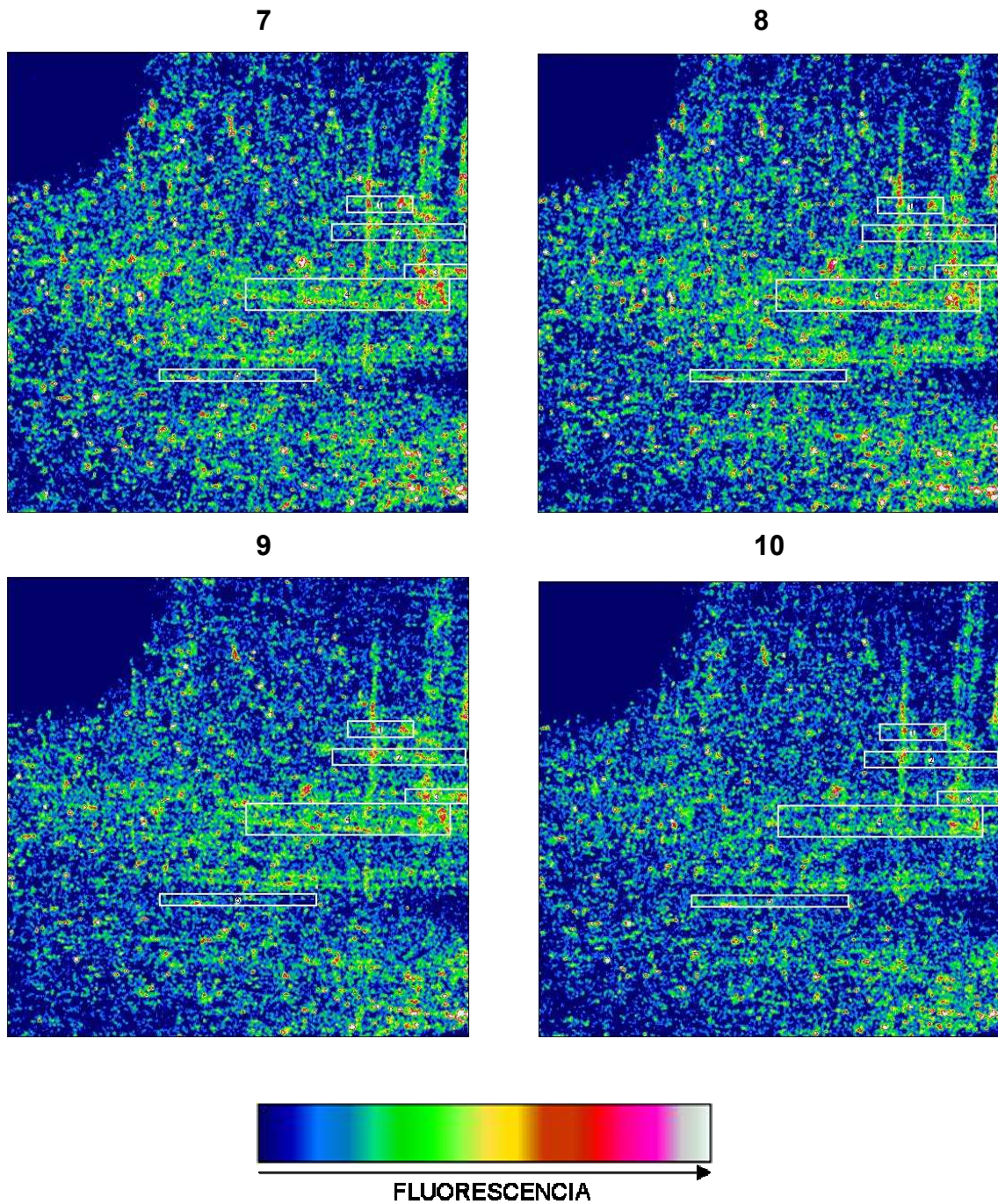


Figura 20: fotografías provenientes del video de microscopía confocal, de los puntos indicados en la figura 19. Los números en los recuadros indican la célula de la figura 19.

2.2 Efecto de CPA

La contracción inducida por phe viene precedida de una acusada elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ que decae y se mantiene por encima de la $[Ca^{2+}]_i$ basal. A continuación se comienzan a producir oscilaciones con distinta frecuencia y amplitud. Tras la adición de CPA la contracción no se ve afectada mientras que tras 5 minutos, las oscilaciones prácticamente desaparecen y la $[Ca^{2+}]_i$ disminuye casi a nivel basal, figura 21.

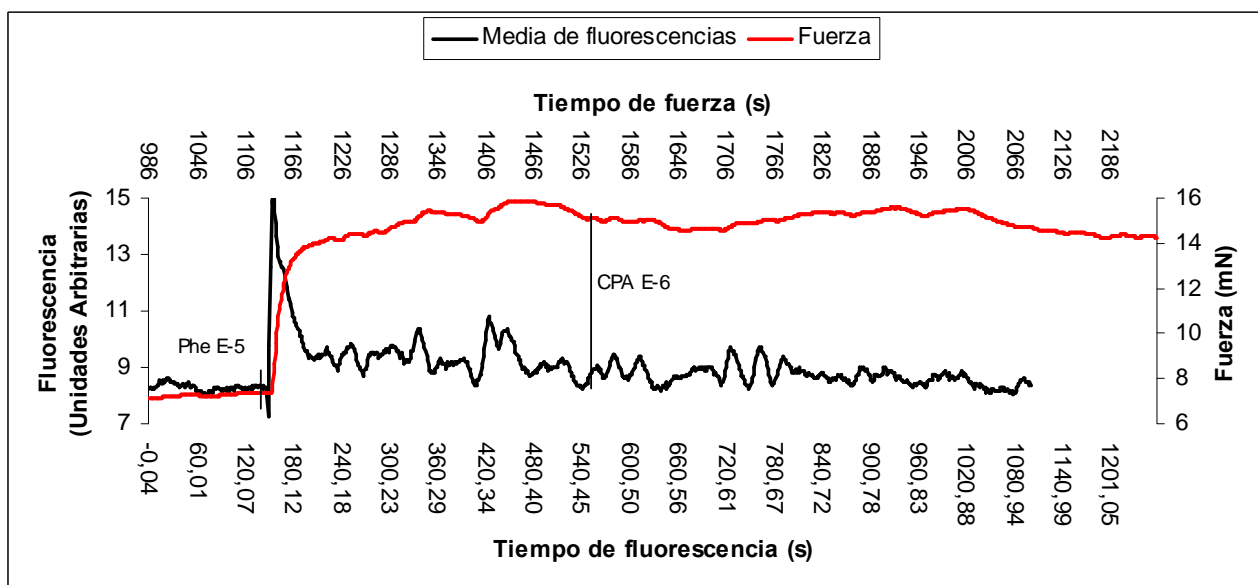


Figura 21: gráfica experimental que muestra la fuerza producida por la arteria y la media de fluorescencia de las 5 células de la figura 22, inducida por phe, a lo largo del tiempo, y los efectos de CPA sobre ambas.

Las escasas oscilaciones previas a la precontracción con phe son distintas entre células y por lo tanto asincrónicas aunque muy débiles. Una vez estimuladas, se produce una sincronía de la $[Ca^{2+}]_i$ de cada célula con las de las demás, dando lugar a oscilaciones sincrónicas que en algunos momentos presentan diferencias de amplitud y frecuencia, o bien alguna célula presenta alguna oscilación que no aparece en las demás, figuras 22 y 23.

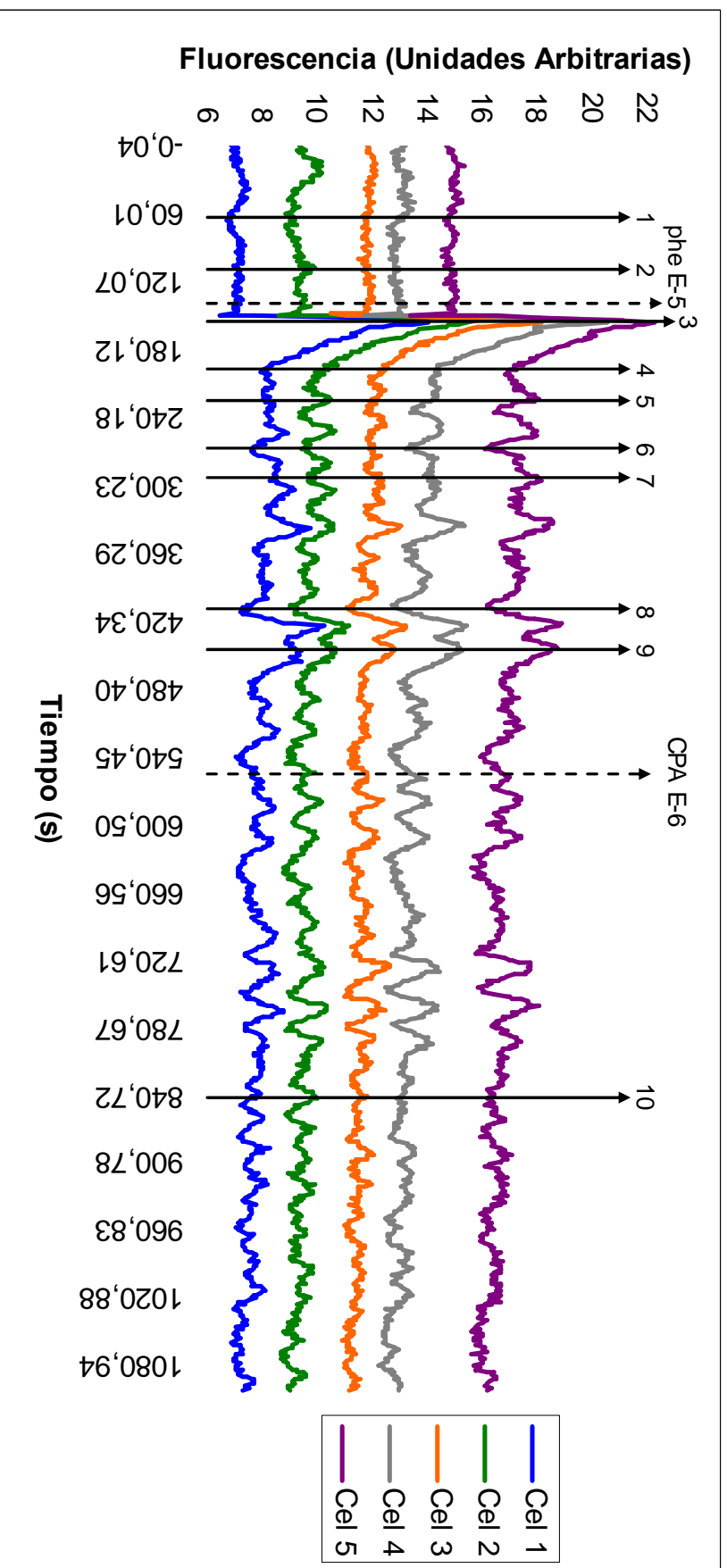
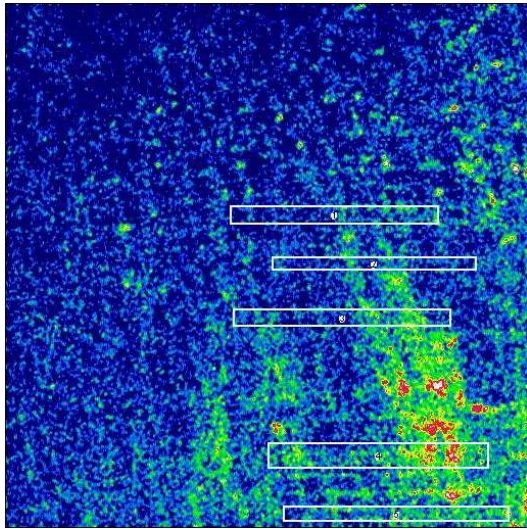
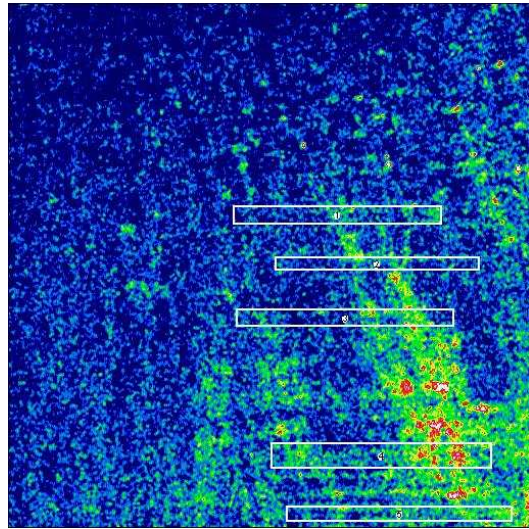


Figura 22: representación gráfica proveniente del video de microscopía confocal, de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ producidas por phe, en 5 células distintas en el tiempo, y el efecto de CPA en ella. Los números representan tiempos seleccionados en la imagen que se muestran como fotografías a continuación.

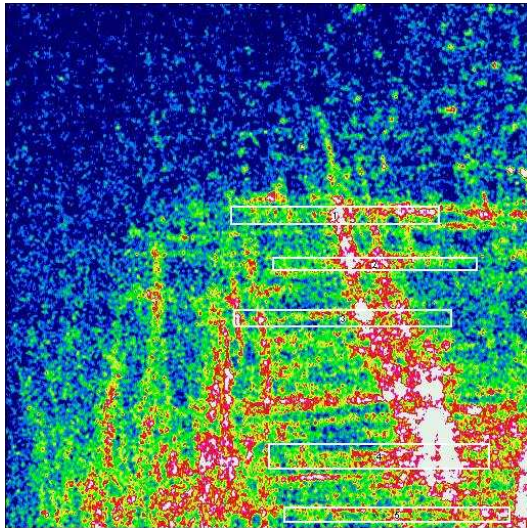
1



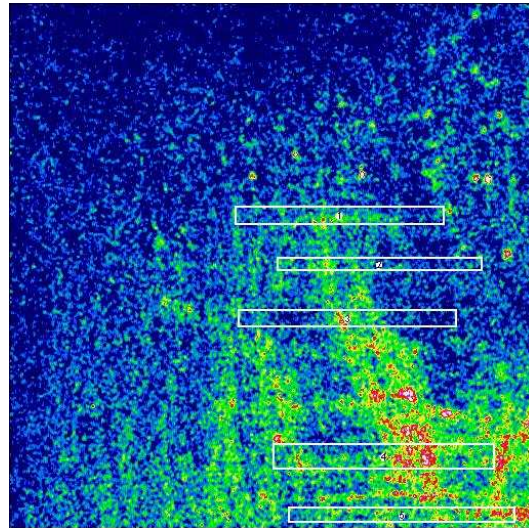
2



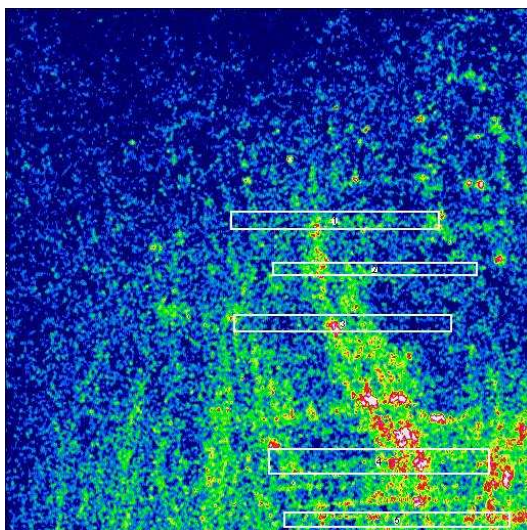
3



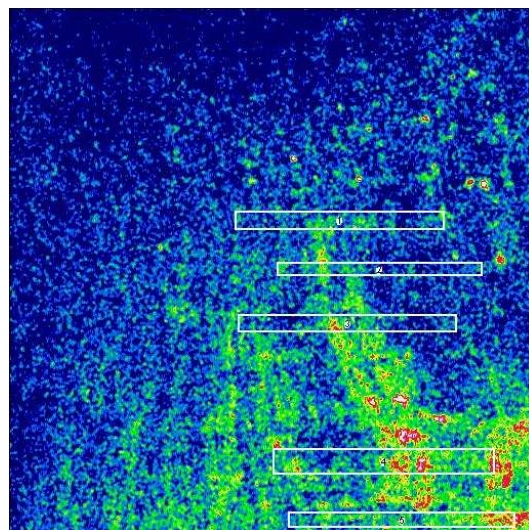
4



5



6



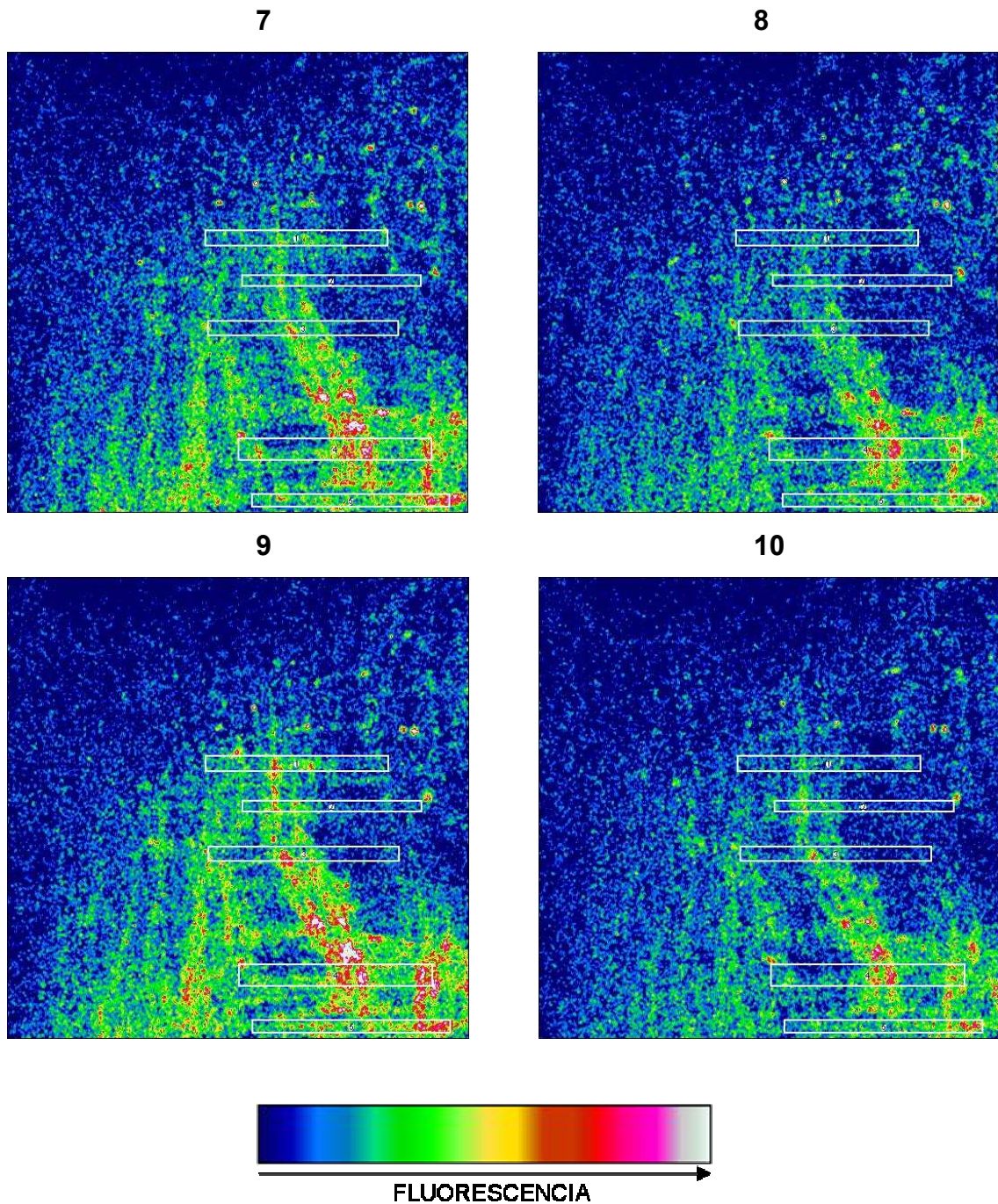


Figura 23: fotografías provenientes del video de microscopía confocal, de los puntos indicados en la figura 22. Los números en los recuadros indican la célula de la figura 22.

2.3 Efecto de HA

Se induce una precontracción con phe que produce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la posterior contracción arterial. El pico inicial disminuye lentamente hasta llegar a la $[Ca^{2+}]_i$ basal volviendo de nuevo a elevarse con la aparición de amplias oscilaciones en el proceso. Una vez se añade HA, pasados un par de minutos se produce una relajación completa de la contracción y una caída de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta por debajo del nivel basal, recuperándose posteriormente, figura 24.

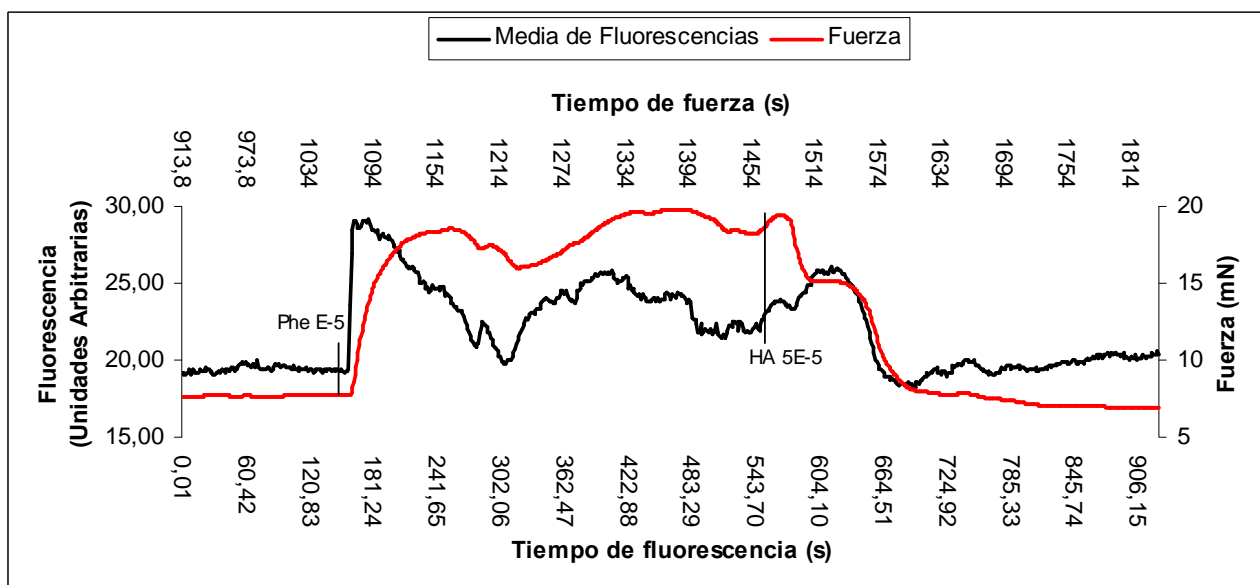


Figura 24: gráfica experimental que muestra la fuerza producida por la arteria y la media de fluorescencia de las 5 células de la figura 25, inducida por phe, a lo largo del tiempo, y los efectos de HA sobre ambas.

Únicamente en la célula 1 se observan oscilaciones previas a la oscilación principal inducida por phe. Esta oscilación produce la sincronización de la $[Ca^{2+}]_i$ entre las células aunque se observa que está algo desplazada en el tiempo. Se producen principalmente dos aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ con oscilaciones durante dichos incrementos, aunque se observan algunas pequeñas oscilaciones distintas entre células. HA disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ a nivel basal y prácticamente hace desaparecer las oscilaciones, figuras 25 y 26.

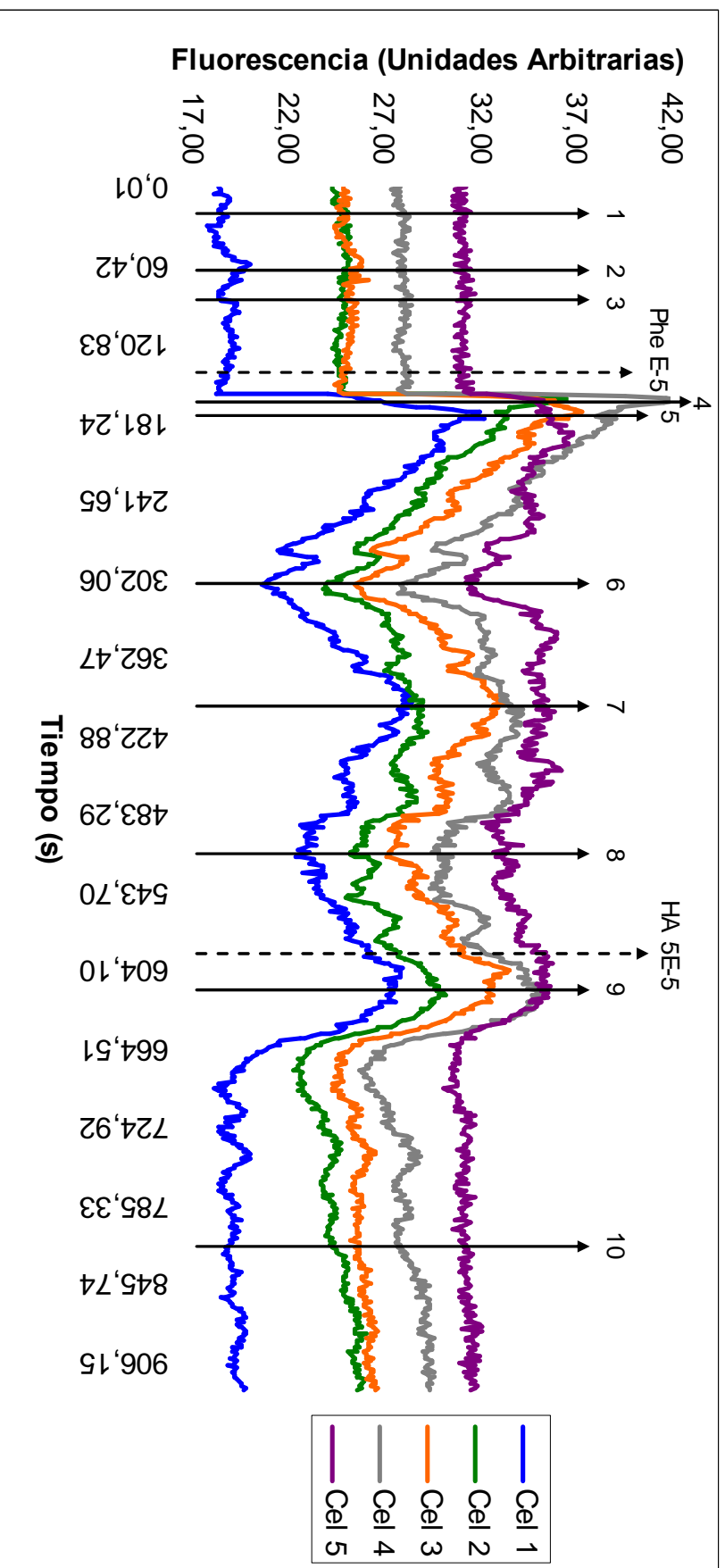
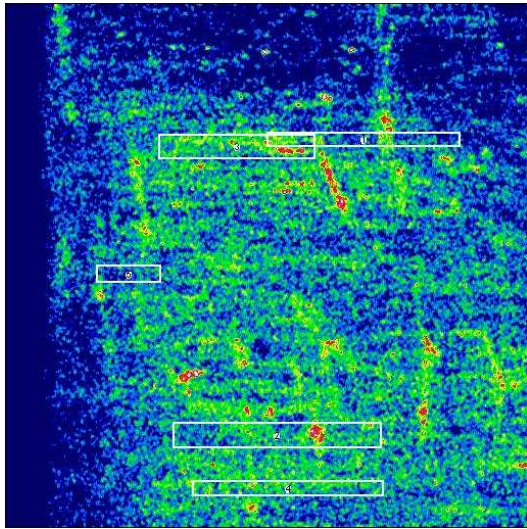
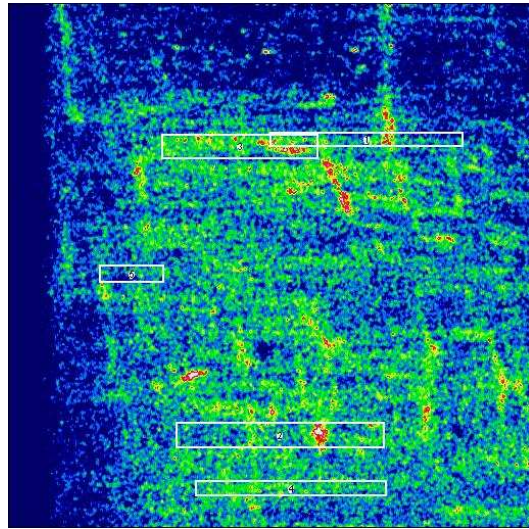


Figura 25: representación gráfica proveniente del video de microscopía confocal, de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ producidas por phe, en 5 células distintas en el tiempo, y el efecto de HA en ella. Los números representan tiempos seleccionados en la imagen que se muestran como fotografías a continuación.

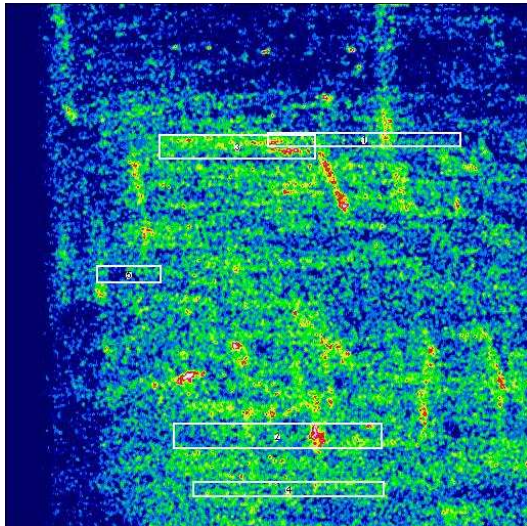
1



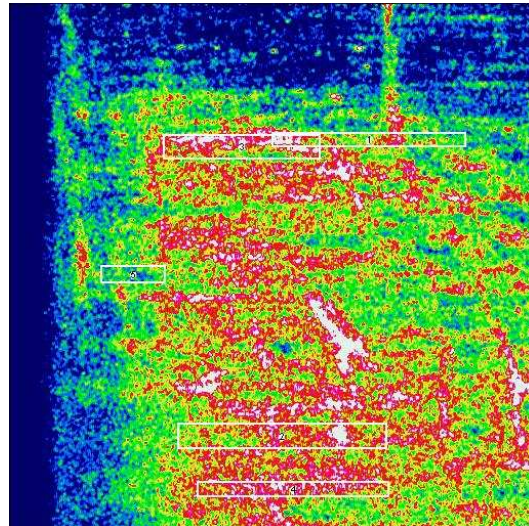
2



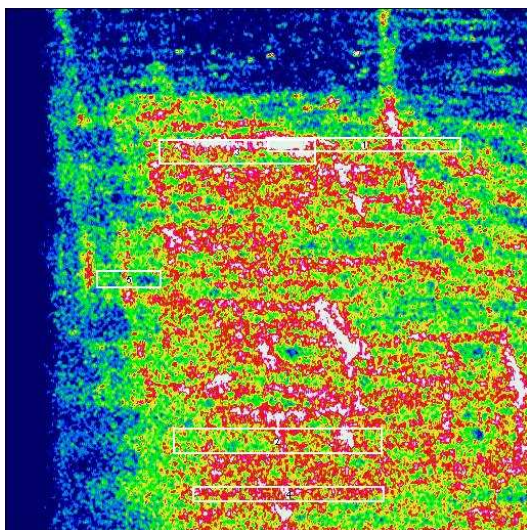
3



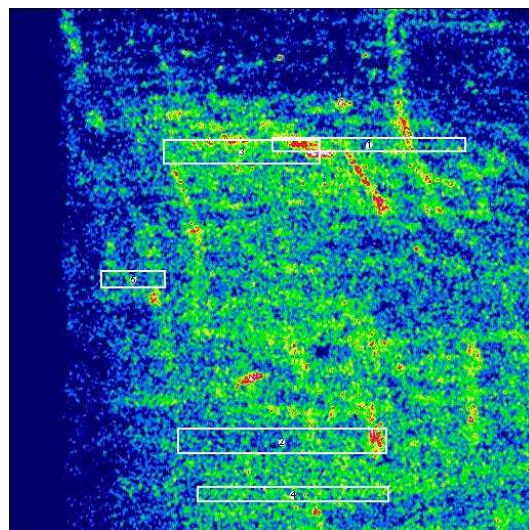
4



5



6



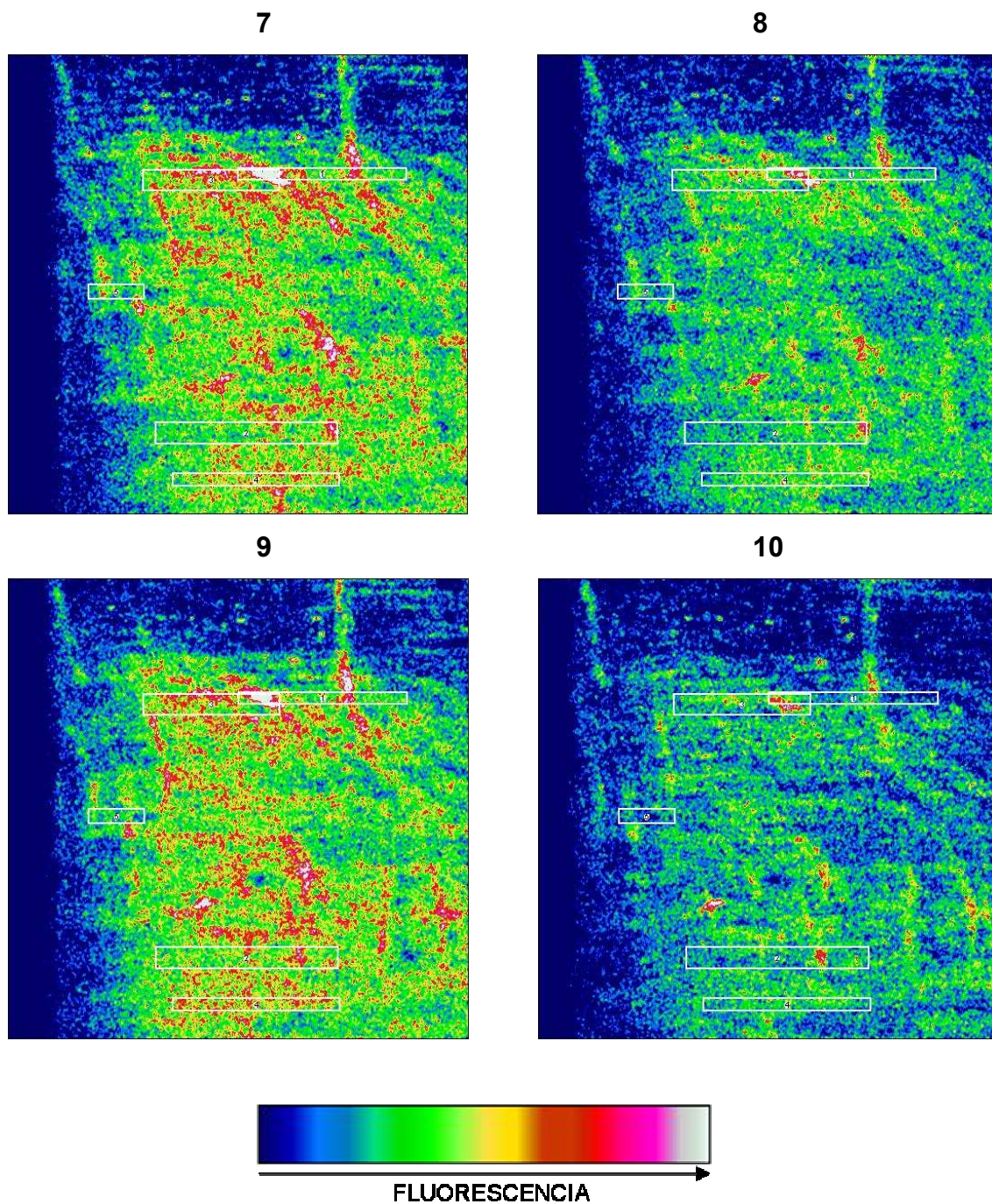


Figura 26: fotografías provenientes del video de microscopía confocal, de los puntos indicados en la figura 25. Los números en los recuadros indican la célula de la figura 25.

2.4 Efecto de Nifedipina

En este experimento la phe produce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en forma de dos pequeñas oscilaciones que producen una ligera contracción. Posteriormente se produce un incremento mayor que produce una mayor contracción. Aunque aparecen pocas oscilaciones la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene elevada prácticamente a la altura de la oscilación principal. Pasados 5 minutos desde la adición de nif, se observa la relajación de la contracción y el descenso de la $[Ca^{2+}]_i$ por debajo de la basal, sin que llegue a recuperarse, figura 27.

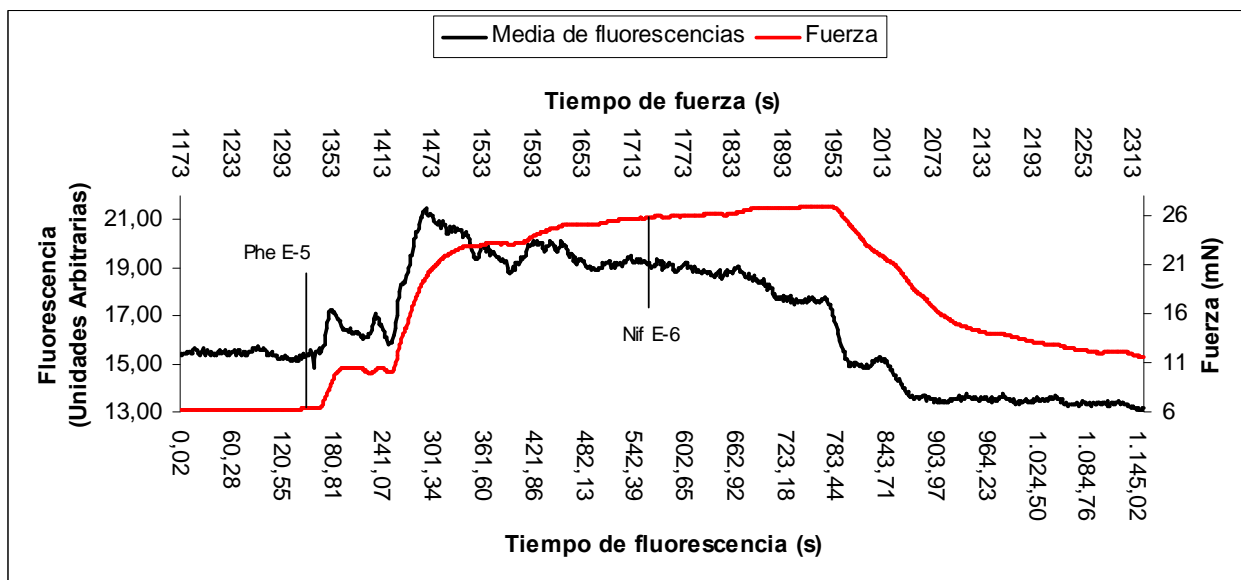


Figura 27: gráfica experimental que muestra la fuerza producida por la arteria y la media de fluorescencia de las 5 células de la figura 28, inducida por phe, a lo largo del tiempo, y los efectos de nifedipina sobre ambas.

Prácticamente no se observan oscilaciones previas a las dos pequeñas iniciales producidas por phe que dan lugar al incremento principal de la $[Ca^{2+}]_i$. Se produce una ligera caída de esa $[Ca^{2+}]_i$ y se mantiene elevada produciéndose escasas oscilaciones sobre ella. La nif reduce la $[Ca^{2+}]_i$ hasta niveles inferiores al basal, sin llegar a recuperarlo, figuras 28 y 29.

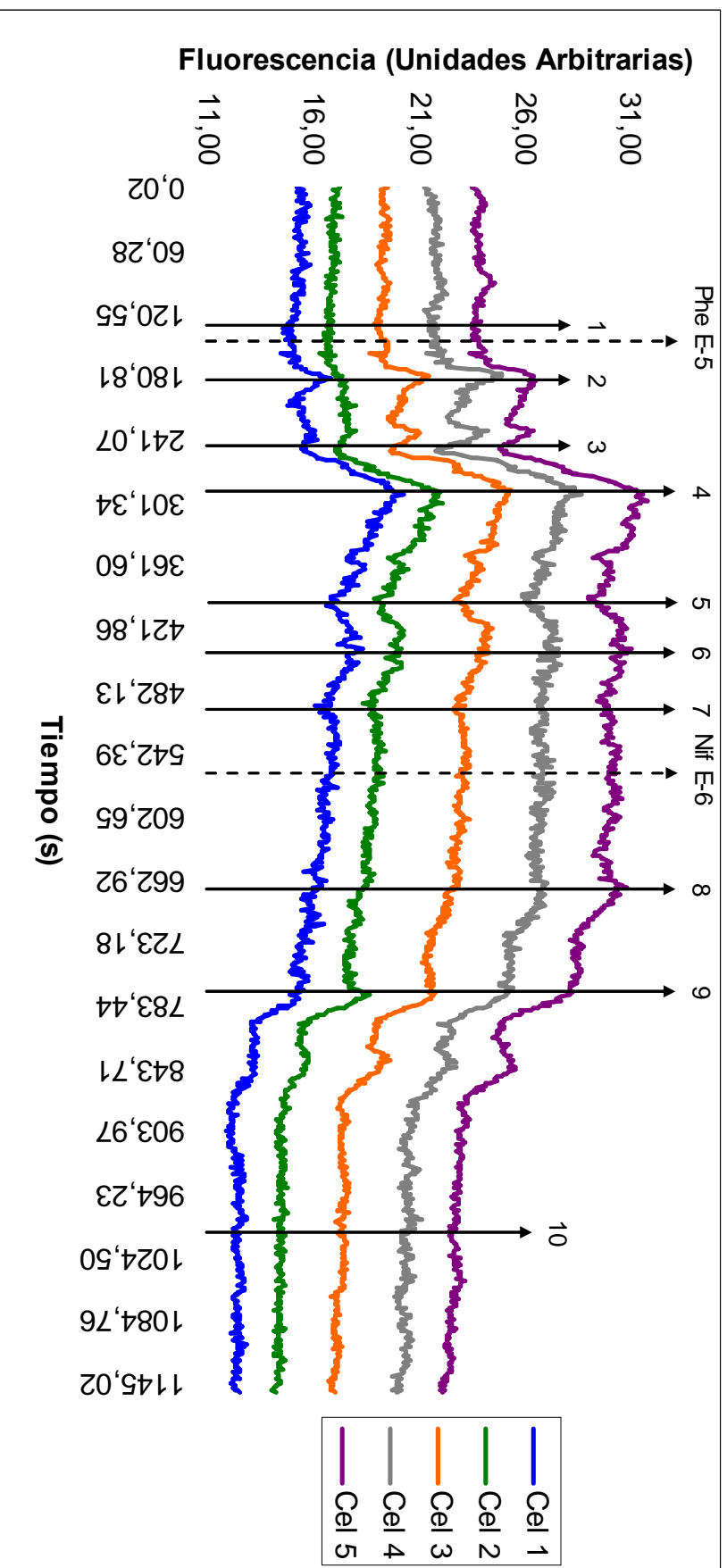
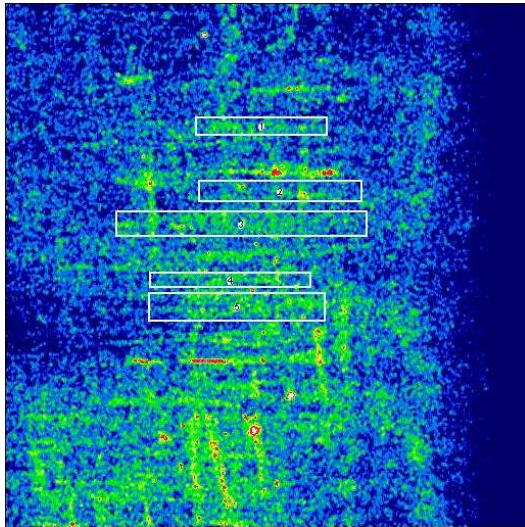
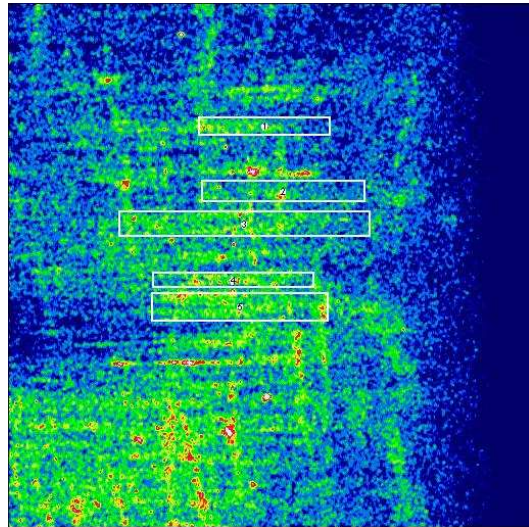


Figura 28: representación gráfica proveniente del video de microscopía confocal, de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ producidas por phe, en 5 células distintas en el tiempo, y el efecto de niE en ella. Los números representan tiempos seleccionados en la imagen que se muestran como fotografías a continuación.

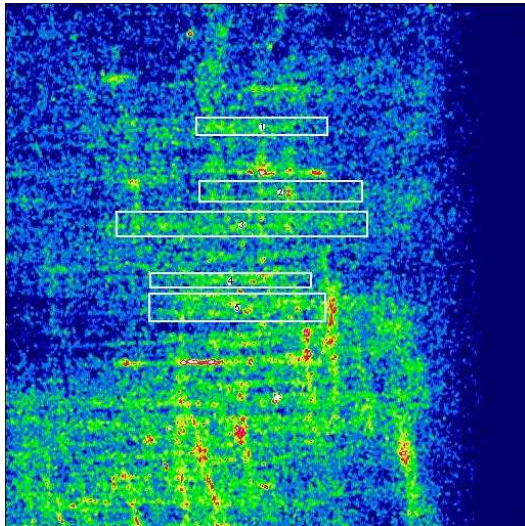
1



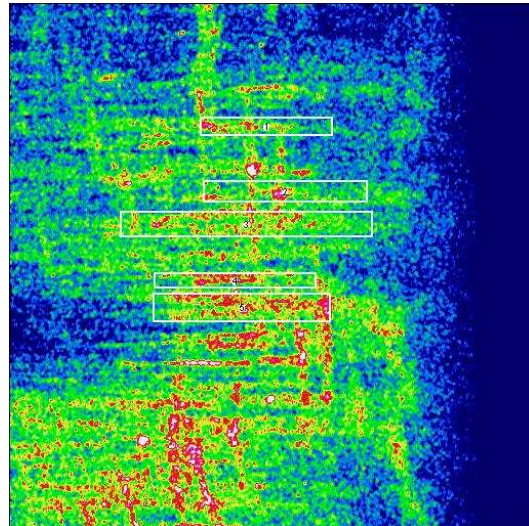
2



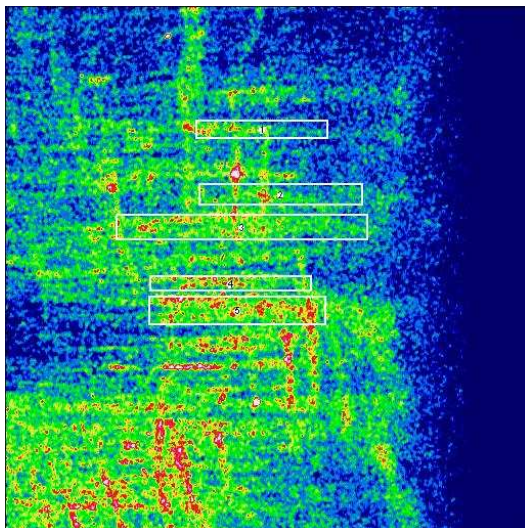
3



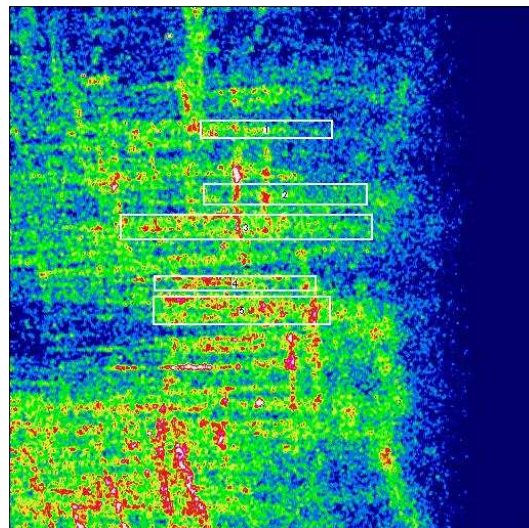
4



5



6



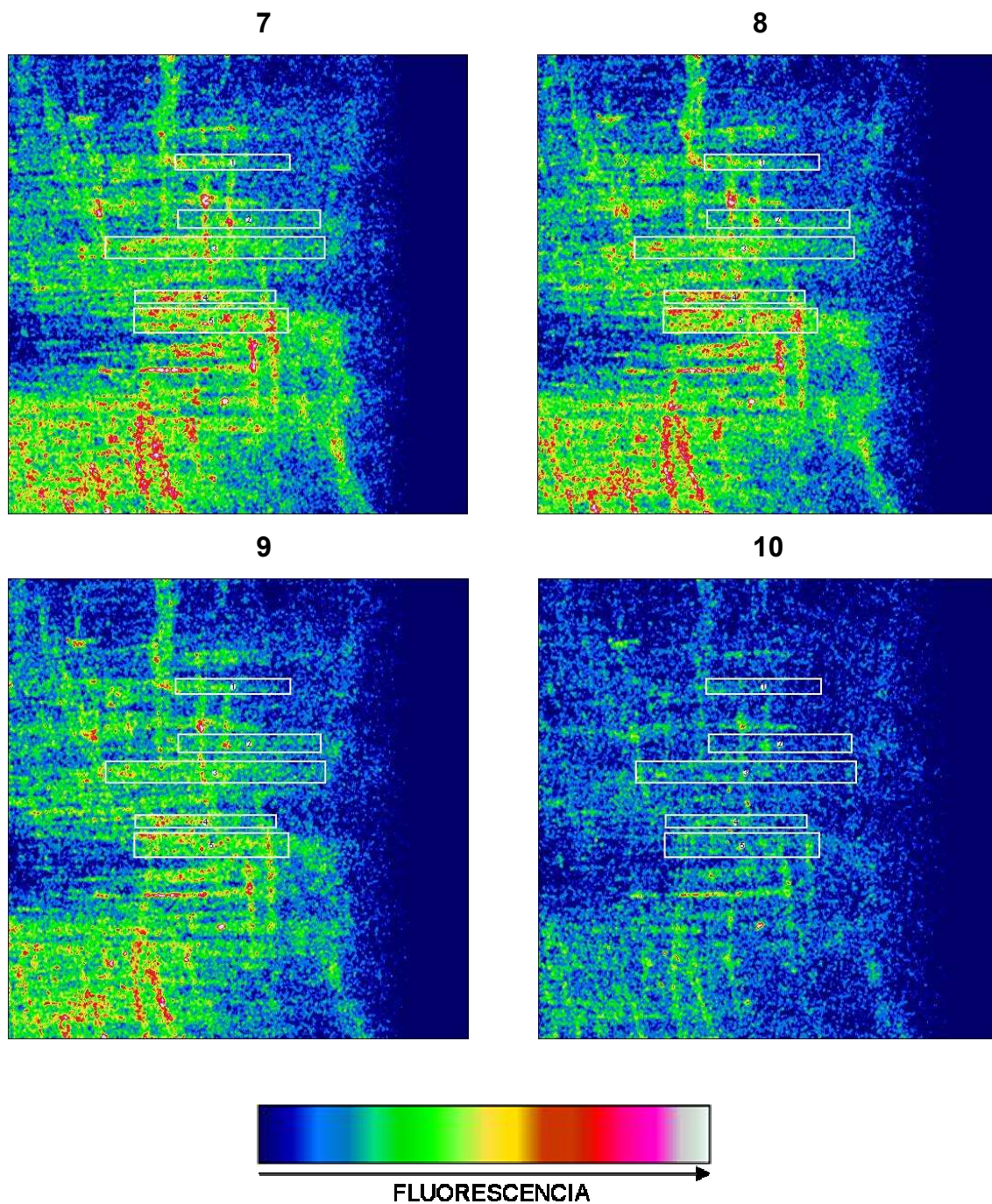


Figura 29: fotografías provenientes del video de microscopía confocal, de los puntos indicados en la figura 28. Los números en los recuadros indican la célula de la figura 28.

3. ESTUDIO ESTRUCTURAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

En este estudio estructural se comprueba si las arterias de pacientes de diversas edades poseen diferencias en la cantidad de retículo sarcoplásmico (RS) superpuesto a la membrana plasmática (MP) a una distancia máxima establecida de 30nm, figuras 30B y 31A y B. Para ello contamos con 11 pacientes, realizando las mediciones en 3 células distintas de cada uno, es decir, n=33.

Px	SEXO	EDAD	DIAB	FUM	HPC	HPT	OB	SDNT	NEOPL
1	M	73		ex	x	x	x	x	x
2	M	38							
3	F	65				x	x	x	x
4	M	79			x	x	x	x	x
5	F	66		x					x
6	M	28							
7	M	49		x	x	x	x	x	
8	M	79							
9	M	72				x		x	x
10	F	66	x		x	x		x	x
11	F	18							

Tabla 4: características de los pacientes cuyas muestras se utilizaron para estos experimentos. Por orden, las características son: sexo, edad, diabetes, fumador, hipercolesterolemia, hipertensión, obesidad, sedentarismo y neoplasia. La x en la casilla indica que el paciente presentaba alguna de esas características.

No se observan diferencias significativas entre pacientes en el porcentaje de RS-MP tras realizar el análisis estadístico, dando como resultado $p=0,4405$, figura 30 A. El % de RS-MP obtenido como media de los valores de todas las células de las arterias procedentes de los pacientes examinados es de un $13,5 \pm 0,93$ %.

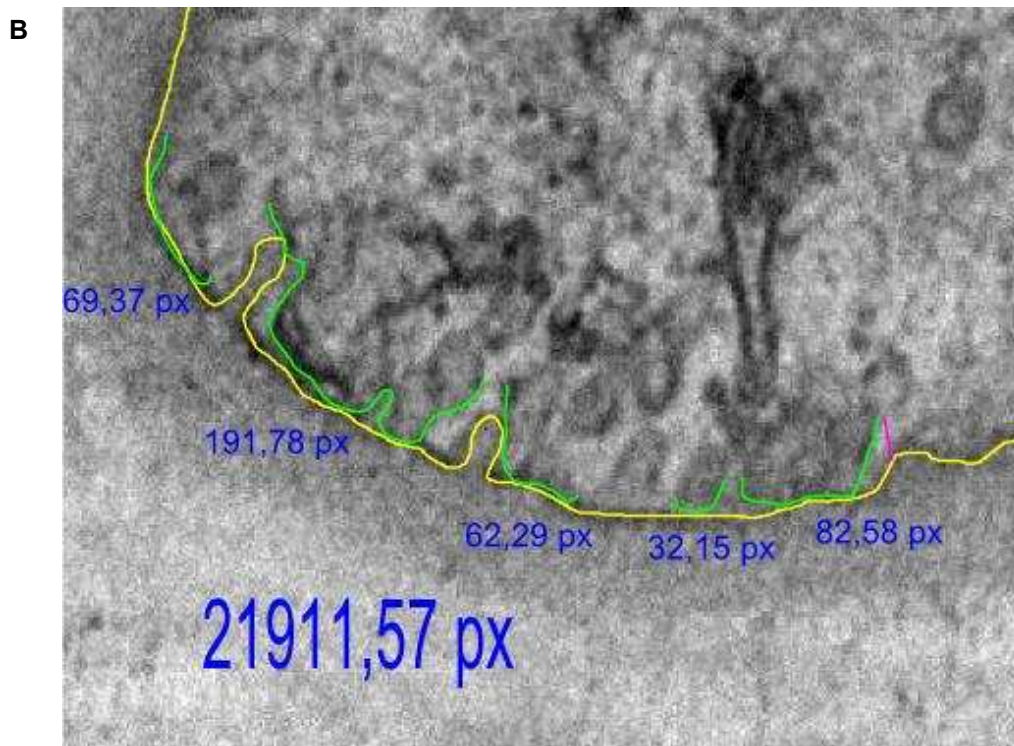
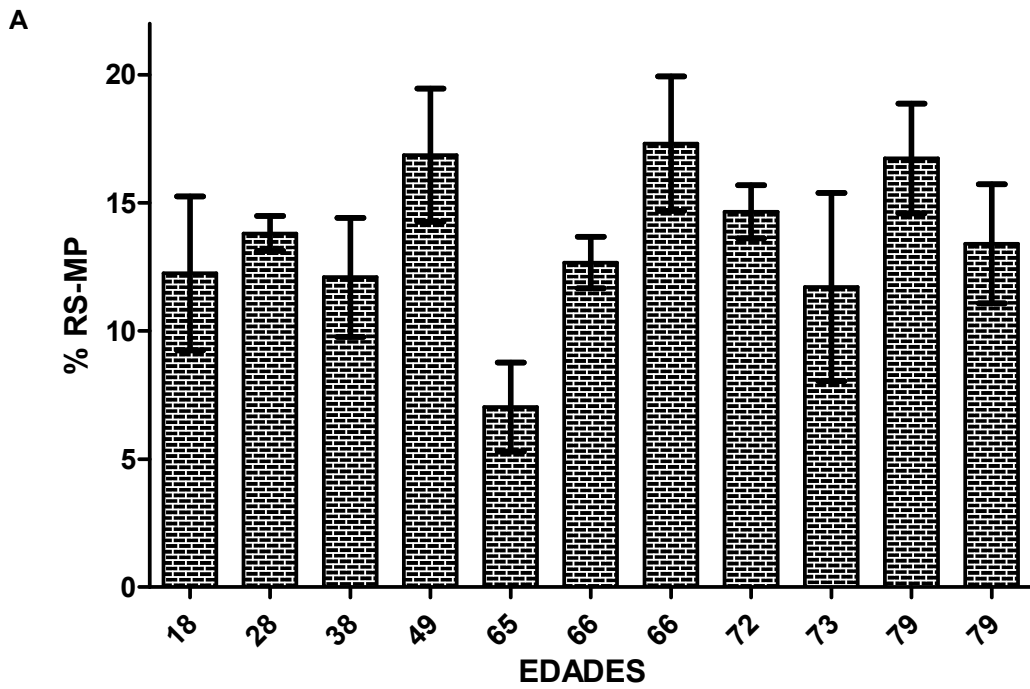


Figura 30: A. Gráfica de barras de las medias de los % de RS-MP con los errores estándar de las medias de 3 células de cada paciente según su edad. B. Imagen del proceso de medición en una célula de un paciente de 28 años.

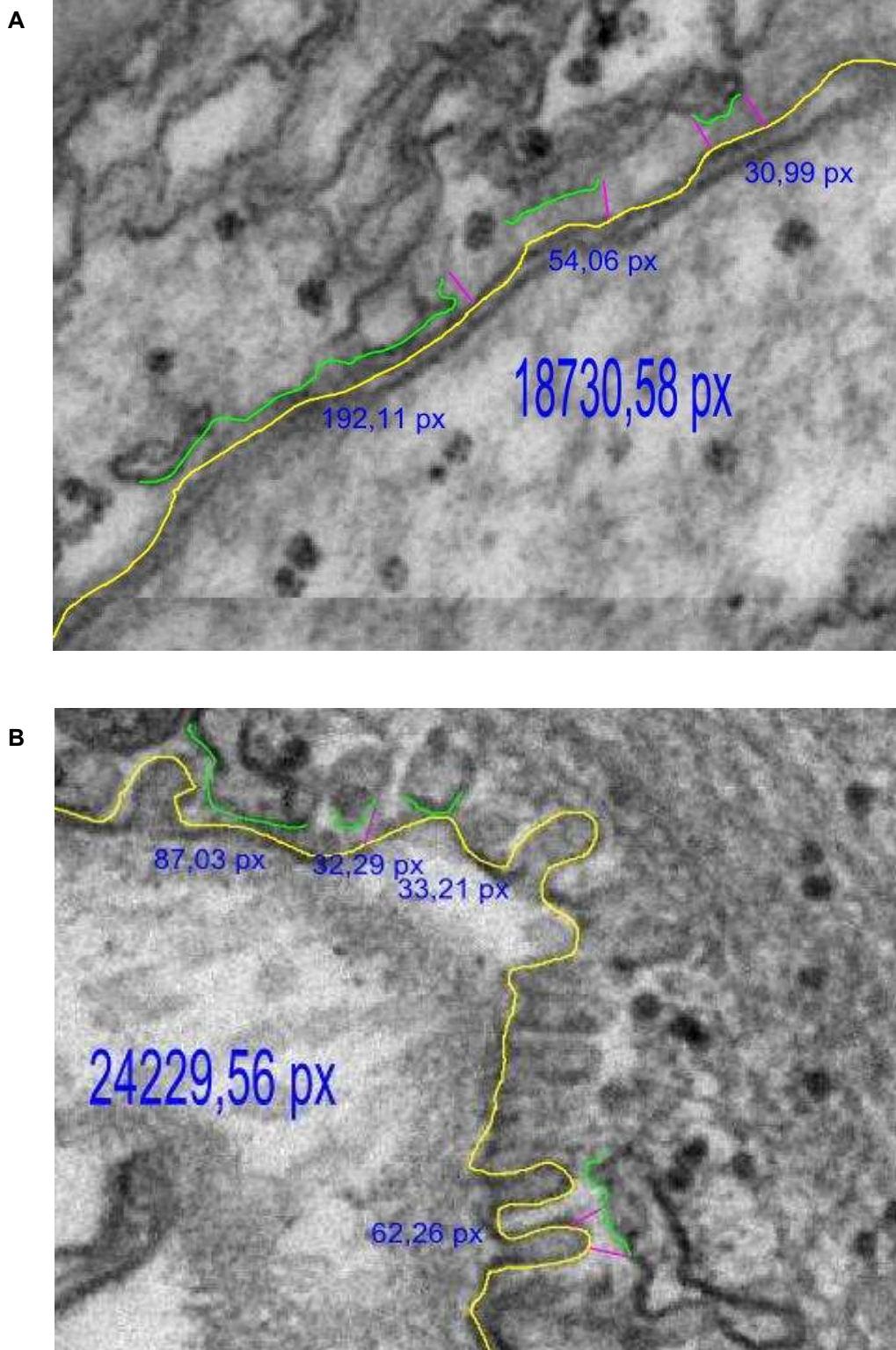


Figura 31: A. Imagen del proceso de medición en una célula de un paciente de 49 años. B. Imagen del proceso de medición en una célula de un paciente de 79 años.

4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RHO A, ROCKS I/II Y P-MYPT1/MYPT1 POR WESTERN BLOTTING

Se cuantifica la expresión de las proteínas RhoA, ROCK I y II en muestras control de 6 pacientes con distintas edades, con n=4 para RhoA y n= 2 para ROCKs.

La cuantificación de la relación P-MYPT1/MYPT1 se realiza para los mismos 6 pacientes, se comprueba que pacientes poseen mayor relación según sus edades, y posteriormente se muestra la fosforilación, inducida por phe, por paciente a distintos tiempos, y el efecto que produce el inhibidor de la Rho kinasa HA-1077 para cada una de esas fosforilaciones en cada tiempo. Para los pacientes de edades 17, 35 y 77 se utilizó una n=6, mientras que para los pacientes de edades 52, 62 y 85 se utilizó n=4.

Px	SEXO	EDAD	DIAB	FUM	HPC	HPT	OB	SDNT	NEOPL
1	17	M							
2	35	M							
3	52	M		x	x				
4	62	M	?	x		x			x
5	77	F				x		x	x
6	85	M			x				x

Tabla 5: características de los pacientes cuyas muestras se utilizaron para estos experimentos. Por orden, las características son: sexo, edad, diabetes, fumador, hipercolesterolemia, hipertensión, obesidad, sedentarismo y neoplasia. La x en la casilla indica que el paciente presentaba alguna de esas características.

4.1 Expresión de Rho A, ROCK I y II

4.1.1 Expresión de Rho A

El análisis estadístico muestra un $p=0,015$, con lo que observamos que la expresión de Rho A en el paciente de 35 años es muy significativa en comparación con la de los pacientes de 77 y 85 años, que además parecen expresar una menor cantidad de Rho A que el resto de pacientes, figura 32.

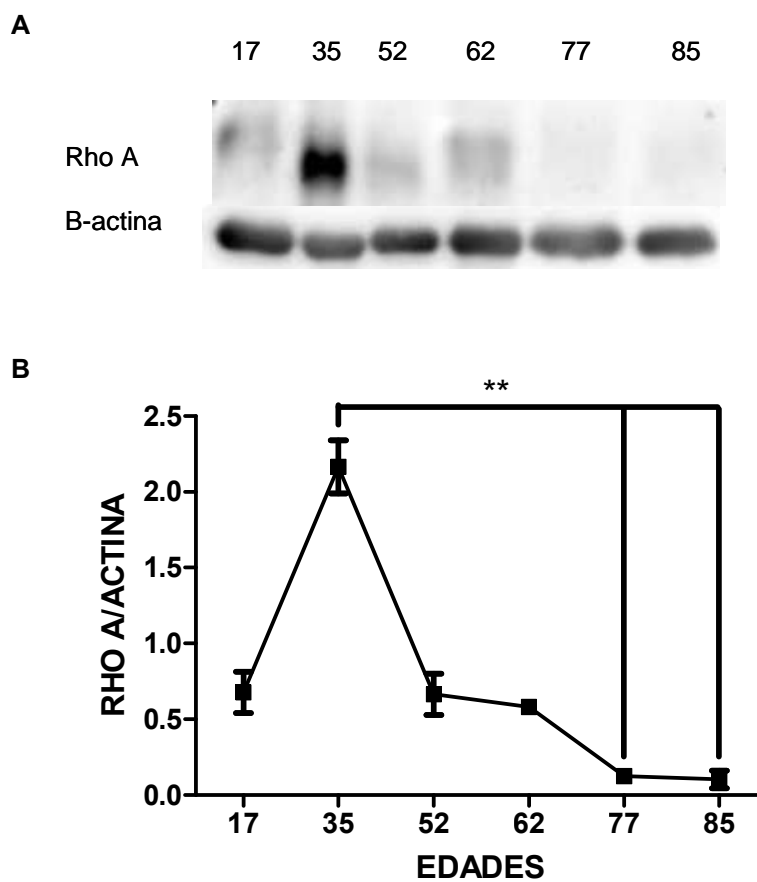


Figura 32: A. Imagen representativa de Western Blot de Rho A y su control de carga para cada edad. B. Grafica de la expresión de Rho A como media y error estándar de la media, según la edad de cada paciente. ** = diferencia muy significativa $p<0,01$.

4.1.2 Expresión de ROCK I y II

Tanto en la expresión de ROCK I como en la de ROCK II se observa que la expresión es mayor en pacientes jóvenes que en adultos y en éstos es mayor que en ancianos. Siendo mayor la expresión de ROCK I frente a la de ROCK II en prácticamente todos ellos, figura 33.

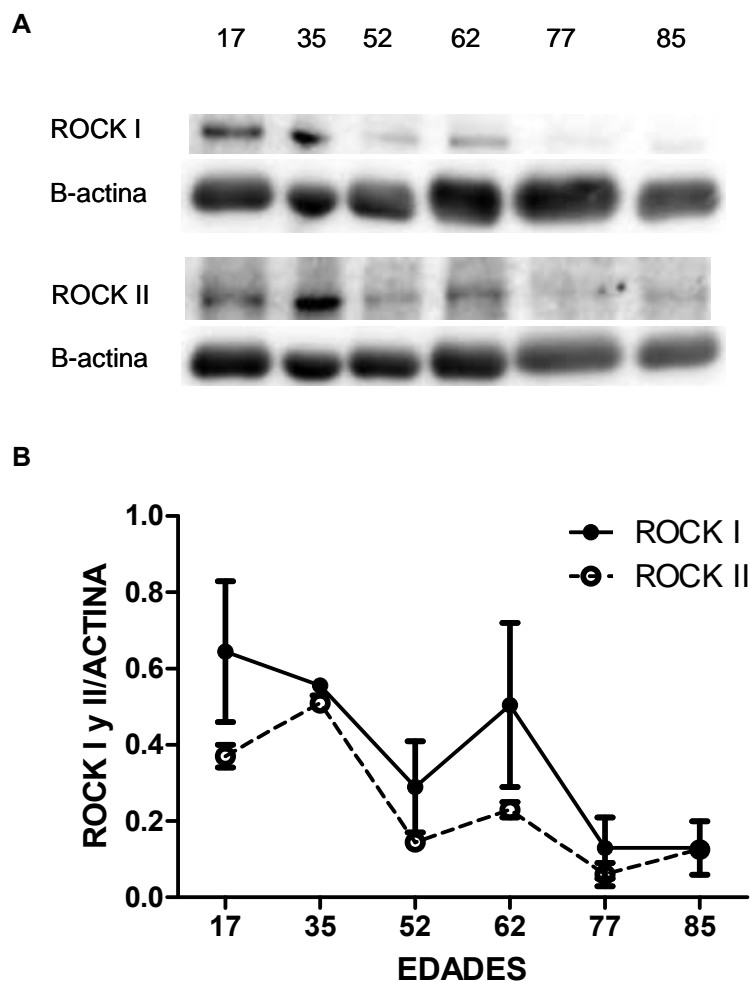


Figura 33: A. Imagen representativa de Western Blot de ROCK I y ROCK II con sus respectivos controles de carga para cada edad. B. Gráfica de la expresión de ROCK I y II, como media y error estándar de la media, según la edad de cada paciente.

4.2 Expresión de P-MYPT1/MYPT1

4.2.1 Expresión de PMYPT1/MYPT1 según la edad

En este experimento de expresión de PMYPT1/MYPT1 donde comprobamos la fosforilación producida por phe según la edad de los pacientes, observamos que al realizar el análisis estadístico obtenemos un $p=0,001$, siendo muy significativa la variación de fosforilación según la edad de los pacientes. Se muestran como altamente significativa la diferencia entre el paciente de 17 y el de 85 años, y muy significativa entre el de 62 y el de 85 años, figura 34.

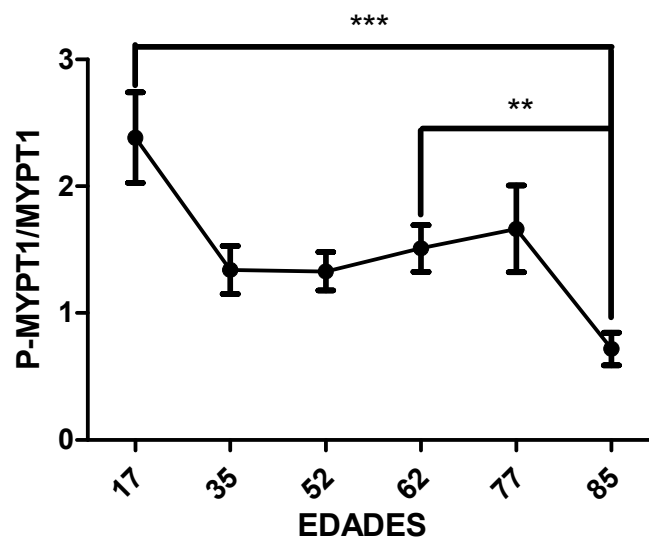


Figura 34: gráfica de la expresión de PMYPT1/MYPT1, como media y error estándar de la media, según la edad de cada paciente. ** = diferencia muy significativa $p<0,01$. *** = diferencia altamente significativa $p<0,001$.

4.2.2 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 17 años

Una vez realizado el análisis estadístico podemos decir que no existe interacción entre tiempo y tratamiento y que ni tiempo ni tratamiento producirían diferencias significativas en la relación PMYPT1/MYPT1. Además, no hay diferencias significativas en la fosforilación de PMYPT1/MYPT1 inducida por phe entre los distintos tiempos frente al control (tiempo 0), aunque a tiempos 15 y 60 se produzca un incremento, en todos los tiempos se mantiene o aumenta de forma no significativa durante al menos 5 minutos. En cuanto a la inhibición producida por HA, sólo se muestra como significativa a tiempo 60 segundos, aunque parece que hay cierta tendencia a reducir la fosforilación según pasa el tiempo, figuras 35 y 36.

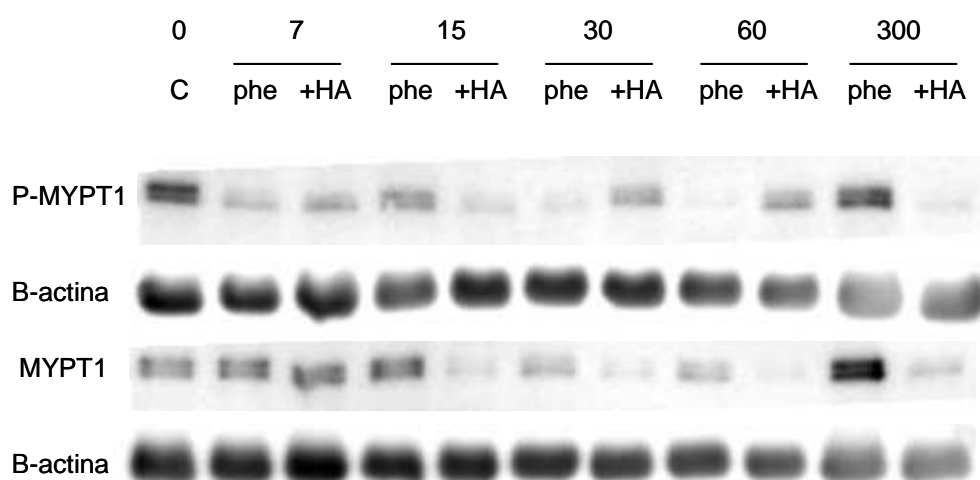


Figura 35: imagen representativa de Western Blot de la fosforilación producida por phe y phe+HA sobre P-MYPT1 y MYPT1, con sus respectivos controles de carga para cada tiempo. phe+HA se representa en la figura como +HA.

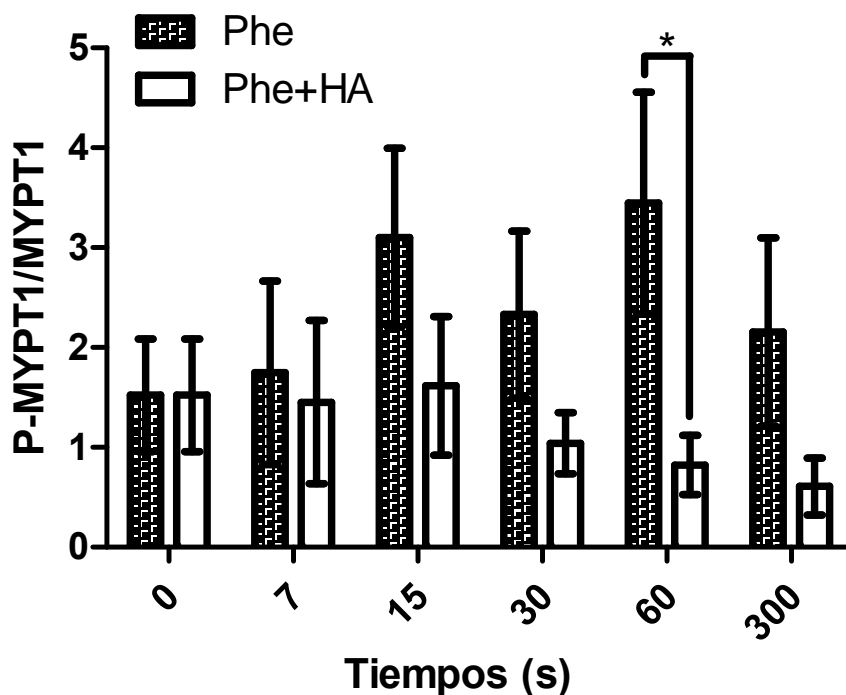


Figura 36: gráfica de la expresión de $PMYPT1/MYPT1$ producida por *phe* y *phe+HA*, como media y error estándar de la media en un paciente de 17 años según varios tiempos. * = diferencia significativa $p < 0,05$.

4.2.3 Expresión de $PMYPT1/MYPT1$ en un paciente de 35 años

Según los resultados del análisis estadístico podemos decir que no existe interacción entre tiempo y tratamiento, y que ni el factor tiempo ni el factor tratamiento producirían modificaciones sobre la relación $PMYPT1/MYPT1$. Además, no hay diferencias significativas en la fosforilación de $PMYPT1/MYPT1$ inducida por *phe* entre los distintos tiempos frente al control (tiempo 0), y se mantiene o aumenta de forma no significativa durante al menos 5 minutos. En cuanto a la inhibición producida por HA, se muestra como significativa a tiempos 30 y 60 segundos, aunque parece que hay cierta tendencia a reducir la fosforilación según pasa el tiempo, figuras 37 y 38.

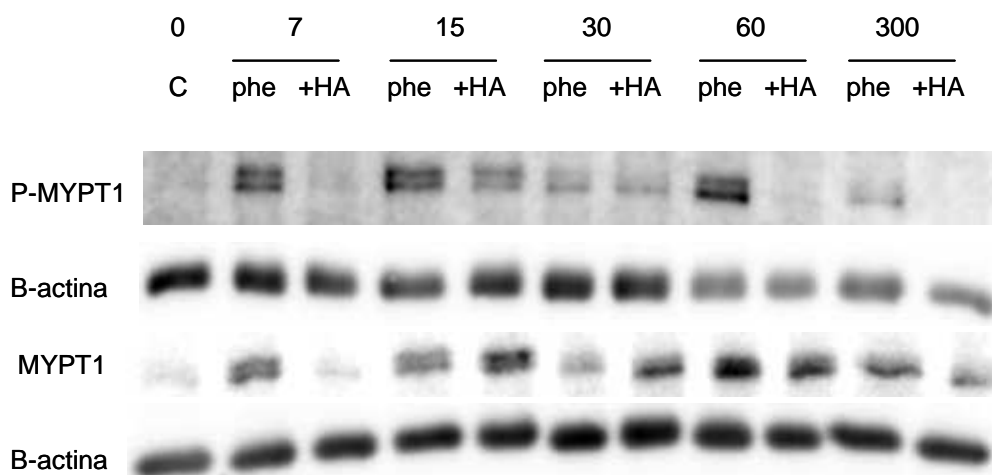


Figura 37: imagen representativa de Western Blot de la fosforilación producida por phe y phe+HA sobre P-MYPT1 y MYPT1, con sus respectivos controles de carga para cada tiempo. phe+HA se representa en la figura como +HA.

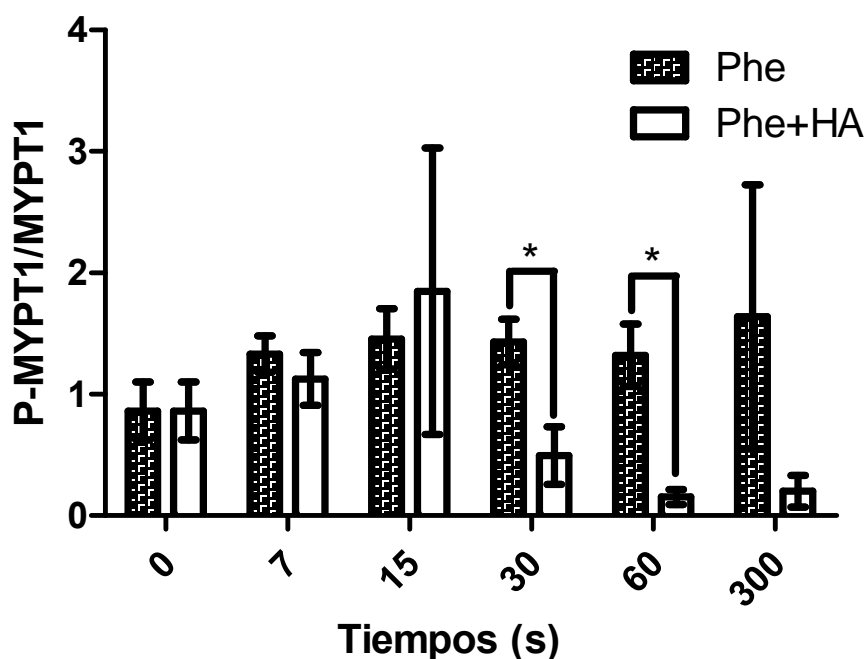


Figura 38: gráfica de la expresión de PMYPT1/MYPT1 producida por phe y phe+HA, como media y error estándar de la media en un paciente de 35 años según varios tiempos. * = diferencia significativa $p < 0,05$.

4.2.4 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 52 años

Tras realizar el análisis estadístico podemos decir que no existe interacción entre tiempo y tratamiento, y que el tratamiento no produciría diferencias significativas en cuanto a la relación PMYPT1/MYPT1, aunque el tiempo si que modifica los resultados, puesto que obtenemos un $p=0,0153$. Además, no hay diferencias significativas en la fosforilación de PMYPT1/MYPT1 inducida por phe entre los distintos tiempos frente al control (tiempo 0), y se mantiene o disminuye ligeramente durante al menos 5 minutos. En cuanto a la inhibición producida por HA, se muestra como significativa en el tiempo 300 segundos, aunque parece que hay cierta tendencia a inhibir la fosforilación según pasa el tiempo, figuras 39 y 40.

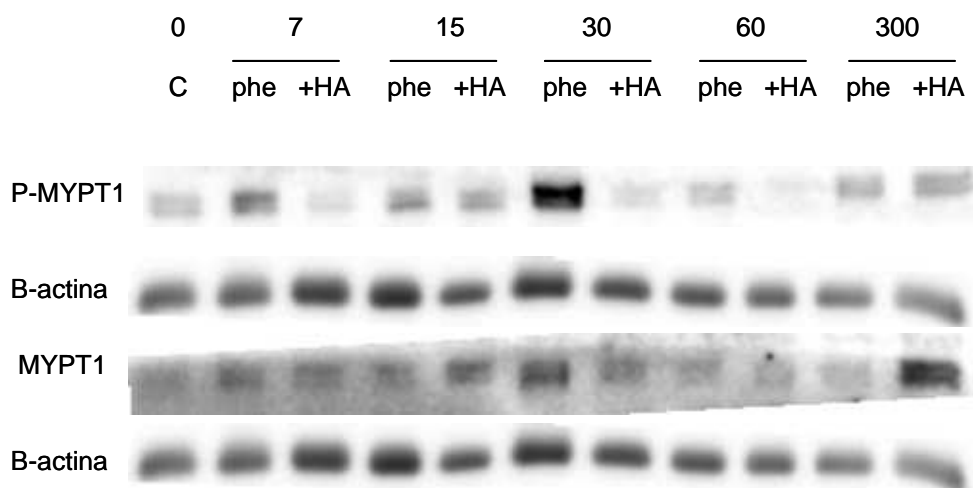


Figura 39: imagen representativa de Western Blot de la fosforilación producida por phe y phe+HA sobre P-MYPT1 y MYPT1, con sus respectivos controles de carga para cada tiempo. phe+HA se representa en la figura como +HA.

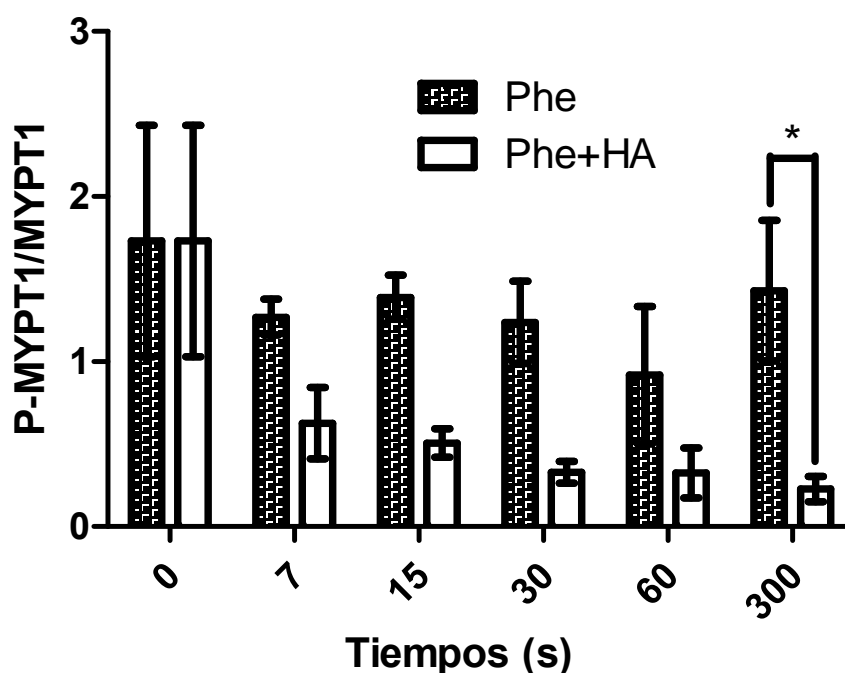


Figura 40: gráfica de la expresión de PMYPT1/MYPT1 producida por phe y phe+HA, como media y error estándar de la media en un paciente de 52 años según varios tiempos. * = diferencia significativa $p < 0,05$.

4.2.5 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 62 años

Tras realizar el análisis estadístico podemos decir que no existe interacción entre tiempo y tratamiento, pero que tanto el tratamiento ($p=0,0017$) como el tiempo ($p=0,0004$) por separado modifican la relación PMYPT1/MYPT1. Además, no hay diferencias significativas en la fosforilación de PMYPT1/MYPT1 inducida por phe entre los distintos tiempos frente al control (tiempo 0), y pese al aumento en tiempos 7 y 15, en todos los tiempos se mantiene durante al menos 5 minutos. En cuanto a la inhibición producida por HA, se muestra como significativa en el tiempo 15 segundos, aunque se observa claramente que se inhibe la fosforilación según pasa el tiempo, figuras 41 y 42.

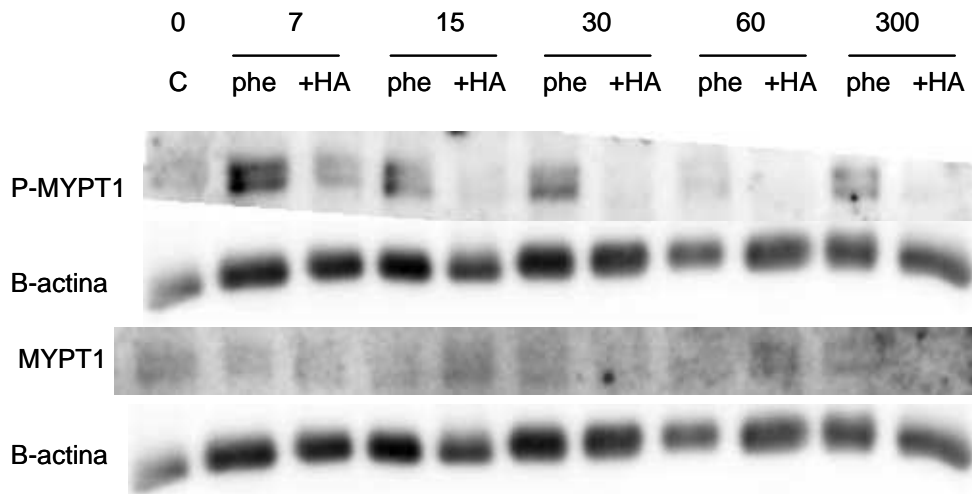


Figura 41: imagen representativa de Western Blot de la fosforilación producida por phe y phe+HA sobre P-MYPT1 y MYPT1, con sus respectivos controles de carga para cada tiempo. phe+HA se representa en la figura como +HA.

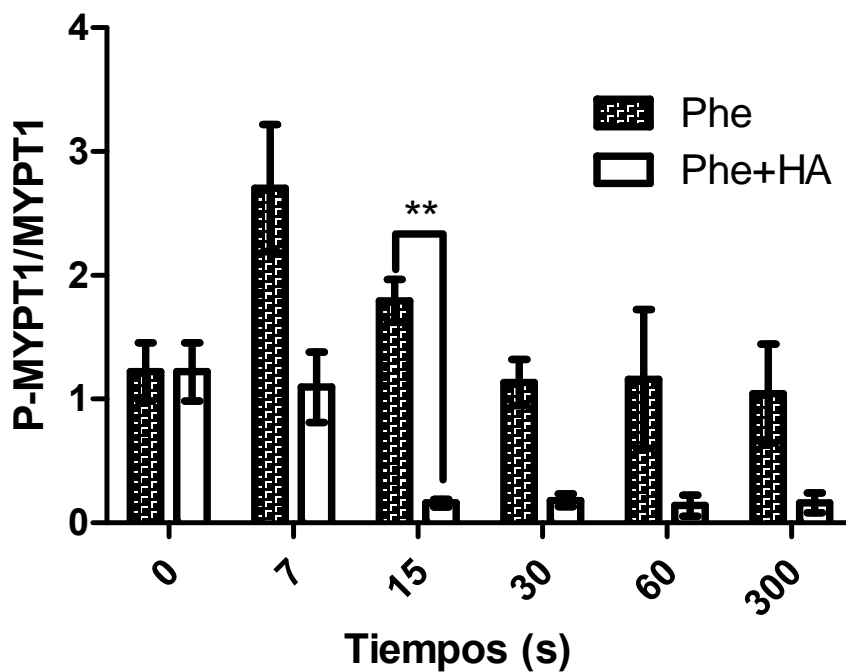


Figura 42: gráfica de la expresión de PMYPT1/MYPT1 producida por phe y phe+HA, como media y error estándar de la media en un paciente de 62 años según varios tiempos. ** = diferencia muy significativa $p < 0,01$.

4.2.6 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 77 años

Tras realizar el análisis estadístico podemos decir que no existe interacción entre tiempo y tratamiento, pero que el tratamiento ($p=0,0356$) produce diferencias significativas sobre la relación PMYPT1/MYPT1, mientras que el tiempo no. Además, no hay diferencias significativas en la fosforilación de PMYPT1/MYPT1 inducida por phe entre los distintos tiempos frente al control (tiempo 0), y aunque hay un incremento a tiempo 7, en todos los tiempos se mantiene durante al menos 5 minutos. En cuanto a la inhibición producida por HA, se muestra como significativa en el tiempo 15 segundos, aunque se observa en general una ligera inhibición frente a los no tratados con HA, figuras 43 y 44.

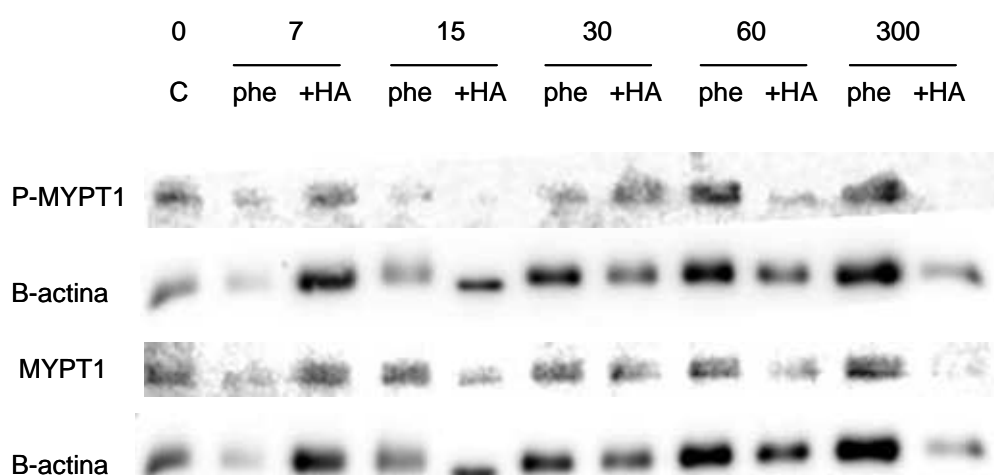


Figura 43: imagen representativa de Western Blot de la fosforilación producida por phe y phe+HA sobre P-MYPT1 y MYPT1, con sus respectivos controles de carga para cada tiempo. phe+HA se representa en la figura como +HA.

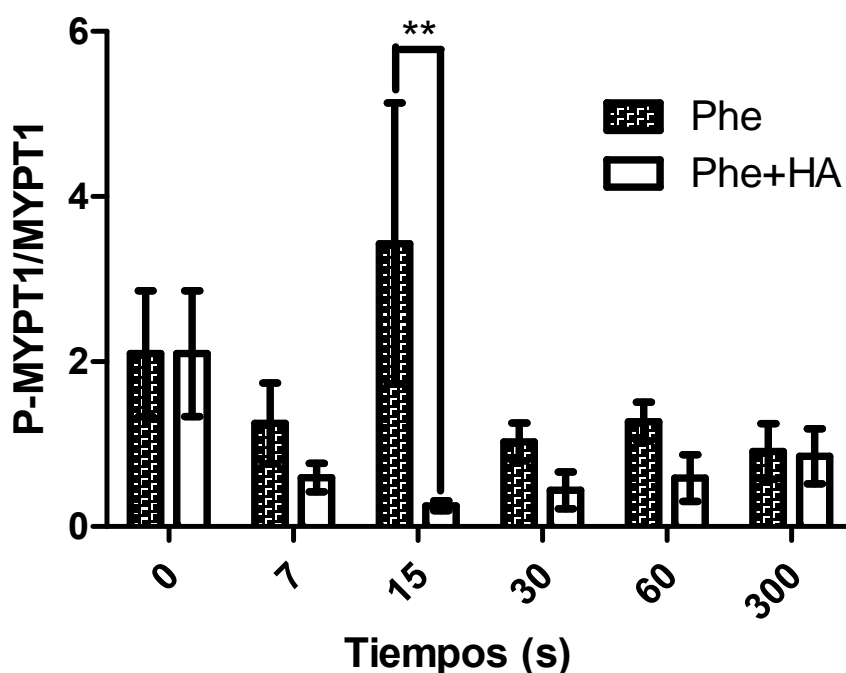


Figura 44: gráfica de la expresión de PMYPT1/MYPT1 producida por phe y phe+HA, como media y error estándar de la media en un paciente de 77 años según varios tiempos. ** = diferencia muy significativa $p < 0,01$.

4.2.7 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en un paciente de 85 años

Mediante el análisis estadístico observamos que no existe interacción entre tiempo y tratamiento, pero que el tratamiento ($p=0,0073$) produce modificaciones en la relación PMYPT1/MYPT1, mientras que el tiempo no muestra diferencias significativas. Además, no hay diferencias significativas en la fosforilación de PMYPT1/MYPT1 inducida por phe entre los distintos tiempos frente al control (tiempo 0), y se mantiene o aumenta de forma no significativa durante al menos 5 minutos. En cuanto a la inhibición producida por HA, se muestra como significativa en el tiempo 15 segundos, y como muy significativa en el tiempo 30 segundos, además se observa claramente que se inhibe la fosforilación según pasa el tiempo, figuras 45 y 46.

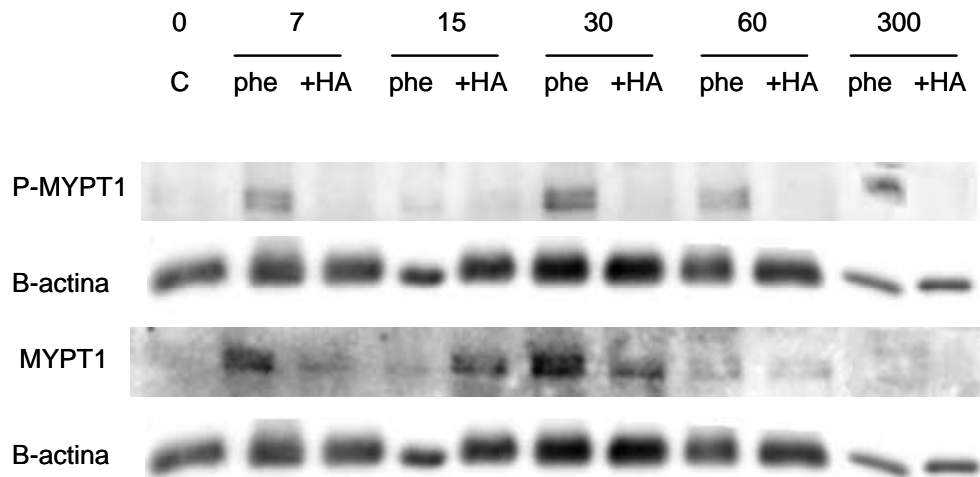


Figura 45: imagen representativa de Western Blot de la fosforilación producida por phe y phe+HA sobre P-MYPT1 y MYPT1, con sus respectivos controles de carga para cada tiempo. phe+HA se representa en la figura como +HA.

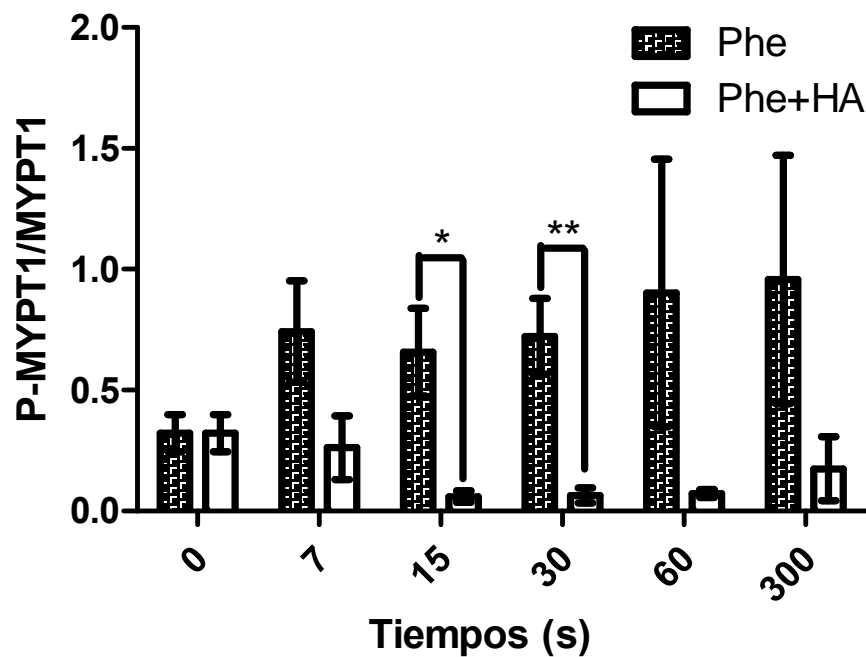


Figura 46: gráfica de la expresión de PMYPT1/MYPT1 producida por phe y phe+HA, como media y error estándar de la media en un paciente de 85 años según varios tiempos. * = diferencia significativa $p < 0,05$. ** = diferencia muy significativa $p < 0,01$.

4.2.8 Expresión de PMYPT1/MYPT1 en el conjunto de los pacientes

Mediante el análisis estadístico observamos que existe interacción entre tiempo y tratamiento, y que tanto el tiempo ($p=0,0347$) como el tratamiento ($p<0,0001$) producen modificaciones en la relación PMYPT1/MYPT1. Además, no hay diferencias significativas en la fosforilación de PMYPT1/MYPT1 inducida por phe entre los distintos tiempos frente al control (tiempo 0), pese al incremento observado a tiempo 15, en todos los tiempos se mantiene o aumenta de forma no significativa durante al menos 5 minutos. En cuanto a la inhibición producida por HA, se muestra como significativa en el tiempo 7 segundos, y como muy significativa en el resto de tiempos, observándose claramente que se inhibe la fosforilación según pasa el tiempo, figura 47.

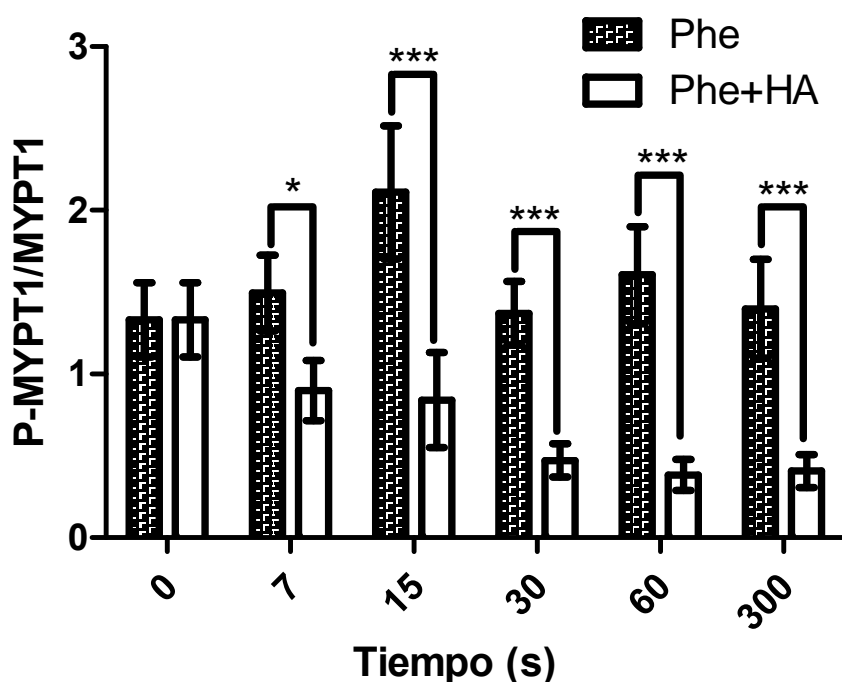


Figura 47: gráfica de la expresión de PMYPT1/MYPT1 producida por phe y phe+HA, como media y error estándar de la media de todos los pacientes según varios tiempos. * = diferencia significativa $p<0,05$. *** = diferencia altamente significativa $p<0,001$.

V. Discusión

1. ESTUDIOS DE REACTIVIDAD VASCULAR

Por medio de estos estudios pretendemos determinar el mecanismo de acción a través del cual se produce la contracción inducida por el vasoconstrictor α -adrenérgico fenilefrina en la arteria mesentérica humana. Además trataremos de comprobar si tales mecanismos son iguales a lo largo de la vida o se modifican según se envejece.

Para esto utilizamos diferentes fármacos que nos permitían ir bloqueando aquellos sistemas a través de los cuales el calcio podría incrementar su concentración citosólica y producir contracción. Comprobamos si existe entrada de calcio (Ca^{2+}) extracelular, utilizando el bloqueante de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje tipo L (VOCC), nifedipina, si se produce entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales operados por receptor (ROCC) o inducido por la liberación de Ca^{2+} desde orgánulos de almacenamiento (SOCC), utilizando el bloqueante de dichos canales, SKF-96365. Además quisimos saber que papel podría jugar el modo reverso de la bomba de intercambio sodio calcio (NCX), bloqueándolo con KB-R7943. El retículo sarcoplásmico (RS) tiene gran importancia en el inicio y mantenimiento de la contracción, por ello comprobamos si esto ocurre también en arterias mesentéricas humanas, así utilizamos un bloqueante de los canales de inositol tri fosfato (IP_3R), el 2-APB, y un inhibidor de la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA), CPA. Por último se utilizó un inhibidor de la Rho kinasa el HA-1077, para comprobar si el proceso de sensibilización al Ca^{2+} ocurre durante la contracción, y que papel juega en ella.

De este modo al añadir nifedipina tras phe observamos que la contracción disminuye (figura 15), al igual que ocurre en arterias de ratón (Dai et al., 2010; Esfandiarei et al., 2010) y en venas humanas (Crowley et al., 2002). Nuestros datos muestran que el porcentaje de relajación producido por nifedipina en arterias mesentéricas humanas es dependiente de la edad, relajando en mayor medida en jóvenes (70%) que en ancianos (50%), aunque en mesentérica de rata no ocurre así, puesto que la relajación entre edades es similar (Rubio et al., 2002). Esta diferencia que registramos de relajación entre edades, se muestra como una diferencia significativa a partir de la cual podemos decir que existe una entrada de Ca^{2+} extracelular en el proceso de contracción de la arteria, y que esa

diferencia de relajación entre grupos de edad implica que al bloquear los VOCC inhibiendo la entrada de calcio extracelular a través de ellos, se mantiene una mayor concentración de calcio intracelular o sensibilización al calcio en ancianos que en jóvenes, siendo menos importante en la contracción de ancianos la entrada de calcio extracelular que en jóvenes. Esto puede ser debido bien a una expresión distinta de los VOCC, cosa que no ocurre en células de músculo liso vascular (CMLV) de ratón (del Corsso et al., 2006), a que los canales no funcionen igual que en jóvenes o bien a que la sensibilidad de los VOCC a dihidropiridinas sea menor, y por tanto se debería tener en cuenta durante el tratamiento a pacientes con un medicamento que posea esta dihidropiridina, que el efecto de este tipo de fármacos en pacientes es distinto según la edad.

Al inhibir la contracción con SKF en nuestros experimentos, pudimos observar que producía aproximadamente un 100% de relajación en todos los grupos de edad (figuras 16 y 17), al igual que ocurre en el músculo anococcígeo de ratón (Wayman et al., 1996) y utilizado junto con nifedipina en vena cava inferior de conejo (Lee et al., 2001). Mientras que con una preincubación con 30 μ M de SKF en hígado de rata se reduce la contracción en un 70% aproximadamente (Burt et al., 1995) y en arteria omental humana no produce disminución de la contracción con noradrenalina, preincubando 30 μ M en presencia o no de nitrendipina (Martínez et al., 2000). Ciertos estudios sugieren que el SKF además de bloquear los ROCC y SOCC con su importante función en la entrada de calcio por capacitancia, también podría bloquear la entrada de calcio extracelular a través de VOCC (Lagaud et al., 1999; Merritt et al., 1990; Zholos et al., 2000). Esto podría estar ocurriendo en nuestro caso puesto que al inhibir los VOCC con nifedipina observamos menor relajación que con SKF, pudiendo éste estar inhibiendo ROCC, SOCC y parte de VOCC, produciendo mayor relajación, al igual que parece que ocurre en arteria prostática de cerdo (Sanchez et al., 2010). Además, esto podría ocurrir debido a que la concentración utilizada en algunos estudios es de 30 μ M, produciendo menor efecto de relajación que el que obtenemos con 50 μ M (Burt et al., 1995; Doi et al., 2000). Aunque podría ser debido a la especie investigada e incluso al tipo vascular o tejido utilizado. Con lo que se debería estudiar más detenidamente si a 30 μ M únicamente se bloquea la entrada de calcio por capacitancia y a mayores concentraciones se inhiben otros canales como VOCC e incluso se

producen otros efectos. De este modo podemos sugerir una entrada de calcio por capacitancia que ayuda a producir la contracción arterial y que posiblemente tenga una segunda función de relleno del RS.

Esa función de relleno del RS se da en algunos casos mediante la activación del modo reverso de la NCX. En nuestras observaciones comprobamos que ese modo reverso actúa de forma importante en jóvenes y va siendo menos importante según se avanza en la edad. De un modo significativo pasamos de tener un 80% de relajación como media en jóvenes a un 35% en ancianos por el efecto del inhibidor de NCX en modo reverso, KBR (figuras 13 y 14). El porcentaje de relajación que se produce en jóvenes se corresponde con lo observado en musculatura bronquial humana (Dai et al., 2007) y en vena cava inferior de conejo (Lee et al., 2001), aunque en estudios previos de nuestro laboratorio no pudimos observar dicho efecto en arteria mesentérica de ratón (Dai et al., 2010), ni otros lo observaron en arteria pulmonar de rata, aunque sí tuvo efecto en ratas espontáneamente hipertensas (Chau et al., 2003). De estas observaciones podemos sugerir que este proceso de entrada de calcio a través de la NCX es dependiente de la especie y el tejido investigado, y que en arterias mesentéricas humanas afecta al relleno del RS en pacientes jóvenes en mayor proporción que en adultos y ancianos.

Como se ha dicho anteriormente, el RS es muy importante en el proceso contráctil. Para comprobar su posible función dentro de nuestras arterias, hemos utilizado dos fármacos, el CPA que inhibe SERCA y el 2-APB que bloquea IP₃R. Los resultados que hemos obtenido con CPA son pocos concretos puesto que, aunque parecería que se produce una relajación en torno al 60%, esto sólo ocurre en jóvenes y ancianos con unos errores muy elevados, mientras que en adultos ese porcentaje baja a un 25% (figuras 10 y 11). No vemos lógica esta separación de resultados entre grupos de edad, puesto que decae en el grupo de edad intermedio para volver a producirse mayor relajación en el grupo de mayor edad. En otras especies y tejidos se ha observado que CPA a una concentración de 10µM induce relajación, como por ejemplo, en torno a un 72% de relajación frente a acetilcolina en musculatura bronquial humana (Dai et al., 2007), un 50% en arteria de la cola de rata (Dreja et al., 2001), o inhibición completa de la contracción por noradrenalina, al preincubar con CPA en arteria pulmonar de rata (González De La Fuente et al., 1995). Viendo que se produce

efecto bloqueante de SERCA en experimentos de otros investigadores, es posible que el resultado obtenido en nuestro caso sea debido a la baja concentración (1 μ M) utilizada o a un escaso número muestral, entre otros factores. Con respecto a 2-APB, diversos autores han comprobado que la relajación inducida por una preincubación de 2-APB a una concentración de 100 μ M sobre noradrenalina y angiotensina en aorta torácica de rata, fue completa (Maruyama et al., 1997), al igual que preincubaciones con 75 μ M inhibieron la contracción de phe en vena cava de conejo (Lee et al., 2001; Lee et al., 2002b) y mesentérica de humano (Dai et al., 2010). Al añadir 2-APB tras una precontracción con acetilcolina en tejido uterino de rata, obtuvieron una relajación del 95% (Ascher-Landsberg et al., 1999), y en arteria peniana de rata tras phe, de un 80% (Villalba et al., 2007). En nuestros experimentos observamos que la relajación producida por 2-APB en el grupo de menor edad es cercana al 100%, aunque según avanzamos en la edad esa relajación va disminuyendo (figura 9), con lo que se podría estar produciendo algún tipo de disfunción, bien sea por un aumento de los niveles de IP₃ que incrementarían la contracción, con lo que 2-APB tendría que bloquear una mayor cantidad de IP₃R activados, aunque según Rubio y colaboradores, dichos niveles no se modifican con la edad (Rubio et al., 2002). O por otras causas como modificación de los IP₃R o bien mecanismos de compensación que mantengan la contracción aunque 2-APB bloquee estos canales. Al igual que ocurre con SKF, algunos autores han descrito la posibilidad de que 2-APB actúe además directamente sobre los canales activados por capacitancia en su proceso de relajación, incluso sin actuar sobre los IP₃R (Braun et al., 2001), lo cual podría ser la causa de la reducción de relajación a lo largo de la edad, aunque esto no ha sido investigado en este estudio. Del uso de CPA y 2-APB, podemos sugerir que en el proceso contráctil de las arterias mesentéricas humanas, el RS tiene un papel fundamental debido a la liberación de Ca²⁺ al espacio intracelular desde los IP₃R, aunque siendo SERCA el único mecanismo de recaptación de Ca²⁺ al interior del RS, no podemos asegurar que el rellenado sea funcional y esta liberación se mantenga en el tiempo por un periodo largo, pese a que por estudios de otros grupos pudiéramos sugerir que así ocurre.

Para comprobar si se produce sensibilización al calcio por rho kinasa durante el proceso de contracción mediado por phe, utilizamos el inhibidor HA-

1077 observando que se produce una inhibición completa de la contracción en todos los casos (figura 12). Resultados similares a los observados en otros estudios, como los realizados en arteria torácica de conejo (Sakurada et al., 2003), vena safena humana (Crowley et al., 2002) y esfínter esofageal humano (Sims et al., 2008). Todo esto nos indica que el mecanismo de sensibilización mediado por Rho A/ROCKs tiene un papel importante en la contracción de arterias mesentéricas humanas.

2 y 3. ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL CON REACTIVIDAD VASCULAR. Y ESTUDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

En la elaboración de esta parte del estudio utilizamos 4 de los 6 fármacos anteriores, 2-APB, CPA, nifedipina y HA, y se trató de comprobar si la contracción que observamos en la arteria mesentérica humana es dependiente de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y de ser así, que tipos de movimientos y flujos de calcio se ven involucrados en ello y como afectan a cada célula y a la arteria en general. Estos estudios se complementan con el estudio de microscopía electrónica, como veremos a continuación.

De una manera descriptiva, las células de las arterias mesentéricas humanas previas a estimulación, apenas presentaban oscilaciones iniciales, o si las presentaban eran muy escasas y no se puede sugerir que esas oscilaciones fueran asincrónicas, como muestran otras investigaciones (Iino et al., 1994; Miriel et al., 1999; Peng et al., 2001; Ruehlmann et al., 2000), aunque, sí que aquellas que se pudieron observar poseían menor frecuencia que las oscilaciones en los movimientos de la $[Ca^{2+}]_i$ posteriores (Peng et al., 2001), inducidos por phe 10 μ M en arterias mesentéricas humanas.

La phe produce, en la mayor parte de las células observadas en nuestras arterias, un elevado incremento inicial de la $[Ca^{2+}]_i$ que decae en algunos casos para dar lugar posteriormente a unas oscilaciones de menor duración y amplitud, o sin reducirse, producen dichas oscilaciones aun con menor amplitud y frecuencia. A continuación de la elevación inicial, se observa el inicio de la

contracción arterial (Somlyo y Himpens, 1989) y cuando esta elevación comienza a disminuir, la contracción se estabiliza en su fase tónica (Rubio et al., 2002). Se observa que la contracción tónica no se suele mantener estable a lo largo de la contracción, si no que en su recorrido puede elevarse o descender según se producen algunas de las oscilaciones, que en este momento son sincrónicas en todas las células. La frecuencia de la oscilación es dependiente de la concentración del agonista (Mauban et al., 2001; Peng et al., 2001; Ruehlmann et al., 2000; Sell et al., 2002). A una concentración alta de phe como la nuestra, las oscilaciones, aunque no en todo momento, puesto que aparecen oscilaciones asincrónicas de algunas células, en su mayoría son sincrónicas y no observamos vasomoción en casi ningún caso. En el caso de Peng y colaboradores en 2001, comprobaron que la máxima concentración producía máxima tensión y desaparición de la vasomoción, mientras que a concentraciones bajas las oscilaciones eran asincrónicas (Iino et al., 1994; Miriel et al., 1999; Ruehlmann et al., 2000) y presentaban vasomoción. Otros observaron por el contrario, que la máxima concentración inducía a la vasomoción (Mauban et al., 2001), aunque no necesariamente consideraban la sincronización el único motivo para desarrollar vasomoción (Schuster et al., 2004), como ocurre en nuestro caso.

En cuanto al uso de los fármacos para caracterizar las oscilaciones observadas, utilizamos 2-APB para comprobar si las oscilaciones eran dependientes de IP₃R, y pudimos comprobar que se producía relajación del vaso y las oscilaciones se veían reducidas en número, y por lo tanto en frecuencia, y en su amplitud, hasta casi desaparecer (figuras 18, 19 y 20), al igual que en arterias mesentérica de rata (Lamont y Wier, 2004) y músculo liso gástrico de cobaya (Fukuta et al., 2002) donde las oscilaciones asincrónicas se eliminaron. De hecho el pretratamiento con 75µM de 2-APB en mesentérica humana inhibió el incremento de [Ca²⁺]_i inducida por phe (Dai et al., 2010), aunque hay estudios que sugieren que 2-APB es un mejor fármaco inhibiendo el inicio de la contracción arterial que bloqueando la fase tónica (Potocnik y Hill, 2001), puesto que al inhibir los IP₃R se ha visto que no se inicia el incremento de [Ca²⁺]_i ni la contracción (Lee et al., 2001; Lee et al., 2002b). Con estos datos podemos sugerir que la contracción iniciada por un incremento en la [Ca²⁺]_i y en parte su mantenimiento viene producido por los IP₃R.

Las oscilaciones iniciadas por IP₃R pueden depender de la capacidad del RS de rellenarse, y para ello realizamos los estudios con CPA. Como comentamos en el apartado anterior el uso de concentraciones demasiado bajas para que CPA produzca un efecto destacado, nos lleva a comprobar que pese a que las oscilaciones se reducen y prácticamente desaparecen (figuras 21, 22 y 23), como en bronquio humano (Dai et al., 2007), músculo liso gástrico de cobaya (Fukuta et al., 2002) y arteriolas retinales de cerdo (Misfeldt et al., 2010), la contracción no suele reducirse en gran medida. Aunque también es cierto que en nuestros experimentos, pese a reducirse e inhibir las oscilaciones, la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene por encima de la concentración basal, como se ha observado en preparaciones de arteria pulmonar de perro (Janiak et al., 2001) y vena cava inferior de conejo (Lee et al., 2001), manteniéndose parte de la contracción. Podría ocurrir que la CPA a una concentración baja produzca su efecto en menor medida y a un tiempo mucho mayor que el utilizado en estos experimentos, puesto que como ya comentamos, debido al microscopio confocal utilizado, la duración de los experimentos oscilaba entre los 15 y los 18 minutos, y de ahí, si bien en nuestros experimentos no lo demostramos, podemos sugerir, como hicimos en el apartado anterior, que el rellenado del RS mediante SERCA es muy importante en la regeneración de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ y por tanto en el mantenimiento de la contracción muscular.

El rellenado del RS es un proceso muy controvertido que juega un papel muy importante en el mecanismo de producción de oscilaciones, ya que fija la sensibilidad de los IP₃R y determina cuando se producirá el inicio de la siguiente liberación de Ca²⁺. Con lo que la frecuencia de las oscilaciones dependerá por tanto de cuan rápido se puede rellenar el RS y ésto de la tasa a la que el Ca²⁺ entra en la célula a través de la MP, lo que explica el porqué de la sensibilidad de las oscilaciones a la variación de la concentración externa de Ca²⁺ (Berridge, 2009).

Se han propuesto diversas teorías acerca del origen del Ca²⁺ con el que se produce el proceso de rellenado, como son, que parte del Ca²⁺ liberado al citosol desde el RS sea recapturado para el rellenado (Iino et al., 1994; Ruehlmann et al., 2000), que el rellenado se produzca a través del Ca²⁺ que entra mediante ROCCs (Dai et al., 2007) o a través del modo reverso de la bomba NCX (Dai et al., 2007; Fameli et al., 2007), e incluso que se produzca

mediante el proceso de entrada de Ca^{2+} por capacitancia a través de SOCCs (Cahalan, 2009; Gibson et al., 1998). Para que estos procesos ocurran, se postuló que se precisa de una zona de difusión restringida de iones de Ca^{2+} que vendría dada por una zona estrecha de escasa separación entre la membrana del RS y la membrana plasmática (MP) (Fameli et al., 2007). Ese espacio estrecho debe de tener una anchura de entre 40-50nm para que la pérdida de Ca^{2+} hacia el citosol sea lo suficientemente pequeña para que se garantice el proceso de rellenado del RS (Lee et al., 2005) a través de SERCA, siendo en una célula el % de RS-MP donde se rellena el RS, de entre 10-15% (Lee et al., 2002a). Al realizar las mediciones en nuestras células (figuras 30B y 31), el % de RS-MP a un máximo de 30nm fue aproximadamente de un 13% de media para todos los pacientes, confirmando dichos estudios y comprobando que el proceso de rellenado según estas teorías podría realizarse de este modo en nuestras células (figura 30A). Además pudimos comprobar que ese % es similar en todas las edades y por lo tanto los posibles problemas de rellenado del RS u otras complicaciones en la contracción vascular, como pérdida de oscilaciones (Lee et al., 2005), derivadas de la edad no son debidas a una posible pérdida de RS o de su separación de la MP.

Una gran parte de los estudios que comprobaron el efecto de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales activados por voltaje (VOCC) tipo L en el proceso de formación y mantenimiento de oscilaciones, muestran que en oscilaciones asincrónicas tipo onda, la nifedipina produce una reducción de dichas oscilaciones y por tanto de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Dai et al., 2007; Kuo et al., 2003; Lee et al., 2001; Lee et al., 2002b). Aunque, en estudios en mesentérica de rata, algunos estudios no observaron disminución de las oscilaciones (Miriel et al., 1999) y otros mostraron que sí se producía y que hacía desaparecer la vasomoción (Schuster et al., 2004). Peng y colaboradores en 2001, comprobaron que la entrada de calcio a través de VOCC no era necesaria para iniciar las oscilaciones, pero sí que la sincronización y la vasomoción eran dependientes de esa entrada de Ca^{2+} , y que la inhibición de VOCC producía pérdida de sincronización y aparición de oscilaciones asincrónicas. En nuestro caso, con arterias humanas, pudimos comprobar que las oscilaciones sincrónicas observadas desaparecen y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye incluso por debajo del nivel basal (figuras 27,28 y 29), como se vio en arteriola retinal de cerdo (Misfeldt et al.,

2010), con lo que podríamos decir que esta entrada de Ca^{2+} a través de VOCC es necesaria para el mantenimiento de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en el proceso de contracción de las arterias mesentéricas humanas.

Quisimos comprobar también si la vía de la Rho kinasa estaba involucrada en el proceso de formación de oscilaciones o si influía en él. Al añadir HA comprobamos que además de obtener una relajación completa, como vimos en los estudios de contractilidad, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuía a nivel basal y las oscilaciones prácticamente desaparecían (figuras 24, 25 y 26), sugiriendo que la vía de la Rho kinasa está involucrada en el proceso oscilatorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en nuestras arterias. Escasos estudios han realizado dicha comprobación. En músculo esofágico humano, HA $10\mu\text{M}$, sólo fue capaz de producir una reducción moderada de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por carbacol, pese a reducir la contracción (Sims et al., 2008) y en aorta de rata produjo el mismo efecto sobre las oscilaciones y la contracción, esta vez inducida por urotensina II (Rossowski et al., 2002).

4. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RHO A, ROCKS I/II Y P-MYPT1/MYPT1 POR WESTERN BLOTTING

En estos experimentos medimos la expresión de las proteínas Rho A, ROCK I y ROCK II, que se encuentran en la vía de señalización del proceso de sensibilización al calcio mediante contracción, por activación de un receptor acoplado a proteína G. Además, medimos la expresión de la forma fosforilada de la proteína MYPT1, que es una subunidad de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), encargada de producir relajación al fosforilar MLC20 en el sistema de sensibilización al calcio. Al fosforilarse esta subunidad, la MLCP se inactiva y por lo tanto se produciría una menor relajación debida a dicha proteína. Medimos la relación entre la fosforilación y la proteína no fosforilada (PMYPT1/MYPT1) en diversas edades y a distintos tiempos de activación, además comprobamos si el inhibidor de la rho kinasa HA-1077 reducía el proceso de fosforilación en nuestras arterias.

La medida de la expresión de la proteína Rho A y ROCK I y II en este estudio en distintas edades, se realizó para comprobar si existe una diferencia

en la expresión de dichas proteínas, que pueda suponer una mayor o menor sensibilización del proceso contráctil según la edad o si por el contrario resulta similar en todos los pacientes. Existen estudios de expresión de Rho A, y ROCKs en pene de rata, que indican que los niveles de estas proteínas son similares en ratas jóvenes y ancianas (Jin et al., 2006), mientras que en otros estudios de vejiga de cobaya, la expresión de dichas proteínas se ve reducida según se avanza en la edad (Gómez-Pinilla et al., 2008), de forma similar a lo que pudimos observar nosotros en nuestros estudios. Pese a que de forma significativa únicamente observamos, en el caso de la expresión de proteína Rho A, diferencias entre los pacientes ancianos de 77 y 85 frente al joven de 35, se observa una tendencia a que la cantidad de expresión de Rho A y ROCKs se reduzca según se avanza en la edad (figuras 32 y 33). Esto indicaría que durante el proceso contráctil la sensibilización al calcio en pacientes de mayor edad resultaría menor y/o podría provocar un mal funcionamiento durante el proceso.

En las mediciones de expresión de PMYPT1/MYPT1, en primer lugar comprobamos si esa relación se modifica con la edad de los pacientes, y posteriormente, en cada paciente realizamos una medición de dicha relación para 6 tiempos (0, 7, 15, 30, 60 y 300 segundos) con el fin de comprobar si se produce fosforilación mediada por phe con respecto al control, y si se produce en algún tiempo determinado, comparándolo frente al control (tiempo 0). Por último, comprobamos si el inhibidor de la fosforilación de Rho kinasa influye en la fosforilación de MYPT1 en dichos tiempos. Con respecto a la expresión de PMYPT1/MYPT1 según las distintas edades (figura 34), pudimos comprobar que existen diferencias significativas entre el paciente joven de 17 años y el adulto de 62 frente al anciano de 85 años. Las diferencias entre el de menor y mayor edad son muy amplias mientras que el resto de edades se mantienen en un nivel similar. En el estudio de vejiga de cobaya comentado anteriormente (Gómez-Pinilla et al., 2008), obtuvieron resultados similares, sugiriendo que el envejecimiento produce deficiencias en la fosforilación de MYPT1 en respuesta a un estímulo, pese a que en el de pene de rata (Jin et al., 2006), los resultados son opuestos y sugieren un incremento en la fosforilación de MYPT1 en ancianos con respecto a jóvenes, sugiriendo un incremento en la actividad Rho kinasa. Aunque ese estudio fue realizado en Thr696 mientras que el nuestro fue en Thr853, y en otros estudios se ha observado que una mayor fosforilación de

MYPT1 en Thr696 se traduce en menor actividad de la MLCP (Feng et al., 1999; Somlyo y Somlyo, 2003). Nosotros podemos sugerir con nuestros datos que el envejecimiento reduce la actividad de fosforilación de Rho kinasa sobre MYPT1 en Thr853 aunque no podemos comprobar si es por una menor cantidad de expresión de proteínas Rho A y ROCKs o por una menor actividad fosforiladora.

Quisimos, como hemos descrito anteriormente, comprobar si la fosforilación se produce de una forma rápida o mantenida en el tiempo, y lo comprobamos por separado para cada paciente. Además, para cada tiempo realizamos el mismo estudio pero con un tratamiento con HA para saber si es efectivo en la inhibición de la fosforilación mediada por Rho kinasa.

En un estudio realizado en arteria basilar de conejo se observó que existía en respuesta a endotelina 1, una tendencia a que la fosforilación de MYPT1 se incrementara al minuto y se mantuviera pasados 5 minutos desde el estímulo (Kikkawa et al., 2012), al igual que ocurre al inducir la fosforilación con suero en aorta de rata (Wang et al., 2009) y en arteria femoral de conejo inducida por phe (Dimopoulos et al., 2007). En otros estudios como en arteria uterina de oveja, la fosforilación aumentaba a los 10 segundos, para reducirse en cierto grado al minuto y elevarse de nuevo al llegar a 300 segundos, aunque menos que el pico inicial de 10 segundos (Xiao et al., 2005). Nuestros resultados son muy variables entre pacientes y dentro de ellos, puesto que presentan unos amplios errores estándar lo que conlleva a que no se observen diferencias significativas. Así, en el paciente de 17 años se observan aumentos a tiempos 15 y 60 aunque el resto no presenta cambios (figuras 35 y 36), en el de 35 hay aumento en todos los tiempos (figuras 37 y 38), en el paciente de 52 años no aparecen aumentos e incluso algunos presentan fosforilación a menor nivel que el control (figuras 39 y 40), en el de 62 años se eleva en 7 segundos, en 15 desciende aun siendo mayor nivel que el control y el resto son similares (figuras 41 y 42), en el de 77 años hay un gran aumento en tiempo 15 y el resto son menores que el control (figuras 43 y 44), y en el paciente de 85 años todos los tiempos presentan mayor fosforilación siendo similar entre ellos (figuras 45 y 46). Con esto se observa que en prácticamente todos los pacientes phe induce una mayor fosforilación con respecto al control en algún tiempo, como ocurre en algunos estudios como el de arteria femoral de conejo, en el que al estimular con phe se incrementa la fosforilación (Dimopoulos et al., 2007), también se observa en arteria torácica

interna de humano al estimular con serotonina (Kandabashi et al., 2002), y en células de aorta de rata al estimularlas tanto con noradrenalina como con ionomicina (Yoshioka et al., 2007). Al observar tanta variabilidad quisimos comprobar si esto ocurría en el conjunto de los pacientes y observamos que se producía un aumento en la fosforilación a tiempo 15 segundos, aunque no de forma significativa, y en el resto de tiempos se mantenía como el control (figura 47).

Por último, para la comprobación de el efecto del inhibidor de la Rho kinasa, HA-1077, añadimos el fármaco a todos los tiempos de todos los pacientes y de nuevo debido a la alta variabilidad cada paciente mostraba inhibiciones significativas a distintos puntos temporales, el de 17 años a tiempo 60 segundos (figuras 35 y 36), el de 35 a tiempos 30 y 60 segundos (figuras 37 y 38), el de 52 a 300 segundos (figuras 39 y 40), el de 62 años a 15 segundos (figuras 41 y 42) al igual que el de 77 años (figuras 43 y 44), y el de 85 años mostraba inhibición significativa a tiempos 15 y 30 segundos (figuras 45 y 46), pero en todos se mostraba una clara tendencia a la inhibición en todos los tiempos pese a no resultar estadísticamente significativa. De este modo, al observar estos resultados en el conjunto de pacientes (figura 47), comprobamos que efectivamente la inhibición producida por HA-1077 era significativa a tiempo 7 segundos y altamente significativa en el resto de tiempos. Esto coincide con los estudios de Dimopoulos y colaboradores de 2007, y los de Yoshioka y colaboradores en 2006 aunque estos fueron realizados con otro inhibidor de Rho kinasa distinto, nombrado Y27632, pero también se observa la gran inhibición de la fosforilación de MYPT1 en respuesta a serotonina en arteria torácica interna humana con HA-1077 (Kandabashi et al., 2002).

Aunque con estos datos no podemos confirmar que phe induzca fosforilación de MYPT1 en comparación con el control, sí parece que podría hacerlo de forma no significativa a tiempo 15 segundos. Queremos sugerir la posibilidad de que la fosforilación de MYPT1 forme parte del mantenimiento de la contracción basal del vaso, puesto que aparece en todos los tiempos control de los pacientes, y puesto que el inhibidor de la Rho kinasa, HA-1077, produce una clara inhibición de dicha fosforilación en cada uno de los tiempos utilizados.

VI. Conclusiones

1. El proceso de contracción de arterias mesentéricas humanas, está mediado por una entrada de calcio desde el espacio extracelular, a través de canales de calcio activados por voltaje, y se produce en mayor cantidad en jóvenes que en ancianos. Además, también se produce entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio operados por receptor, y por entrada de calcio por capacitancia.

2. El retículo sarcoplásmico a su vez forma parte del mecanismo de contracción de dichas arterias. Los canales operados por inositol tri fosfato del retículo sarcoplásmico forman parte de dicho proceso mediante su apertura y consecuente liberación de calcio desde el retículo, dicha liberación es mayor en jóvenes que en ancianos.

3. El rellenado del retículo sarcoplásmico puede producirse a través de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA), que capta el calcio proveniente de la entrada a través del modo reverso de la bomba de intercambio sodio calcio, la cual ve afectada su funcionalidad con la edad.

4. El mecanismo de desensibilización al calcio mediado por las proteínas Rho A, ROCK I y II, tiene un papel importante en la relajación de arterias mesentéricas humanas.

5. Fenilefrina induce en arterias mesentéricas humanas, un elevado incremento de la concentración intracelular de calcio, que se transforma en oscilaciones de la concentración intracelular de calcio, sincrónicas entre células.

6. Del incremento de la concentración intracelular de calcio deriva una contracción arterial fásica, producida a escasos milisegundos, que se transforma en contracción tónica, mantenida por las oscilaciones de la concentración de calcio intracelular. Dichas oscilaciones dependen de: la entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio activados por voltaje, de canales operados por receptor, del proceso de entrada de calcio por capacitancia, de la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico mediado por canales

dependientes de inositol tri fosfato, y de la vía de sensibilización al calcio de las Rho kinasas.

7. Las arterias mesentéricas humanas presentan una cantidad de retículo sarcoplásmico superpuesto a la membrana plasmática suficiente para que se produzca un relleno eficaz del retículo sarcoplásmico, no siendo este relleno dependiente de la edad.

8. La expresión de las proteínas involucradas en la vía de señalización al calcio de las rho kinasas, Rho A, ROCK I y ROCK II presenta una tendencia a disminuir según se avanza en la edad. Además, la expresión de la fosforilación de la subunidad MYPT1 de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina presenta una tendencia a disminuir según se llega a edades muy avanzadas.

9. La expresión de la fosforilación de MYPT1 en cada tiempo observado, es inhibida por el inhibidor de la Rho kinasa, HA-1077, y su inhibición es mayor según se avanza en el tiempo.

10. En resumen: el proceso de contracción en arterias humanas es dependiente de calcio extracelular y de calcio procedente del retículo sarcoplásmico, algunos de los mecanismos contráctiles involucrados se ven modificados por el envejecimiento. Los movimientos intracelulares de calcio que forman parte del proceso contráctil se presentan como oscilaciones sincrónicas. El proceso de contracción puede verse afectado por la sensibilización al calcio, pudiendo ser dependiente de la edad, mientras que en la relajación el proceso de desensibilización tiene un papel importante.

ENGLISH SUMMARY

I. Introduction

1. ARTERIES

1.1 Origin of the arteries

The arteries used for this study were: superior mesentery, inferior and appendicular.

Arteries are divided into elastic, with big diameter, and smooth muscle cells and elastic laminae in the medial layer. And muscular, which decrease in diameter as they approach the periphery, with more muscular cells in the medial layer (Rhodin, 1980).

1.2 Arterial structure

1.2.1 Intima

Is the layer surrounding the artery lumen. Comprised of an endothelial cell monolayer, a basal layer and a subendothelial layer.

Endothelial cells are flat and elongated with a 0,2-0,5 μ m thickness (Rhodin, 1980).

1.2.2 Media

Comprised of muscular cells, an internal and external elastic layers which are fenestrated, and collagen fibers and an elastic fibers network (Rhodin, 1980). The vascular smooth muscle cells (VSMC) are small (2-10 μ m in diameter and 20-600 μ m in length) and mononuclear, located concentrically in layers. These cells have gap junctions that allow the flux of ions and other molecules, and potential passage from one to another (Costa, 1995; Rhodin, 1980).

1.2.3 Adventitia

Is the external layer of the vascular wall, usually wider in muscular arteries. It is formed by dense fibroelastic tissue, connective tissue, fibroblasts and tissue

macrophages (Gutterman, 1999). It provides stability to the vascular wall and connects the vessel with surrounding tissues, also transports nutrients to the VSMC and innervate the vessel (González et al., 2001; Rhodin, 1980). Figure 1.

Figure 1: scheme of the arterial wall layers and arterial wall cut modified from Lysis, 2000.

2. CALCIUM

Calcium appears in the organism as a divalent cation Ca^{2+} , it is an essential extracellular electrolyte in the regulation of intracellular functions such as proliferation, transcription, migration, contraction, exocytosis and cell death among others (Berridge, 2009; Karlstad et al., 2012; Puzianowska-Kuznicka and Kuznicki, 2009), figure 2.

Figure 2: calcium-activated cellular functions according to time and distance, modified from lino 2010.

Since Ca^{2+} regulates some much processes, quite a high amount of channels and transports will take part in the regulation of the entry and exit of the ion through the plasma membrane (PM) (Berridge et al., 2003; Karlstad et al., 2012).

2.1 Calcium homeostasis

Homeostasis is defined as the ability of a system to regulate itself in a way it maintains stable, that is, in constant conditions (Schwaller, 2012). Ca^{2+} metabolic regulation is essential for VSMC, due to the maintenance of the Ca^{2+} gradient between the extracellular space and the free cytosolic Ca^{2+} (Marin et al., 1999). Ca^{2+} entrance rate to the internal cellular space is very low (Orallo, 1996). The passive entry seems to have different routes to stimulation ones, since its function is to maintain low $[\text{Ca}^{2+}]_i$, essential for homeostasis (Lee et al., 2002; Orallo, 1996).

Activation of contractile machinery in VSMC requires the $[Ca^{2+}]_i$ to exceed $1\mu M$ (Marin et al., 1999; Orallo, 1996). There are specific homeostatic mechanisms that regulate and maintain under certain critical levels the $[Ca^{2+}]_i$, except to produce cellular responses (Clapham, 2007; Karlstad et al., 2012; Lee et al., 2002; Marin et al., 1999; Orallo, 1996). These mechanisms are summarized in, figure 3:

2.1.1 Calcium entry across channels

Entry can be through voltage operated calcium channels (VOCC), receptor operated calcium channels (ROCC) (Marin et al., 1999), or store operated calcium channels (SOCC) (Gibson et al., 1998; Xu and Beech, 2001).

In smooth muscle VOCC are mainly L-type and function using the cellular electrochemical gradient (Karlstad et al., 2012). Are activated by membrane depolarization (Karaki et al., 1997; Pacaud et al., 1991), allowing the extracellular calcium to cross to the cytosol, contributing to the contraction development and calcium release from storage organelles (Crowley et al., 2002; Hall et al., 2006; Orallo, 1996). These channels are blocked by dihydropyridines (Long et al., 1999).

Non-voltage dependant Ca^{2+} channels are ROCC, activated by agonists that act in a range of G-coupled receptor proteins, and SOCC, which are activated by calcium release from sarcoplasmic reticulum (SR) (McFadzean and Gibson, 2002). SOCC are also known as capacitative calcium entry channels because they are not activated by the calcium released from the SR, otherwise are activated when SR channels are opened. Its function is to refill the SR and determine the contractile state of muscle cells (Berridge, 2009; Cahalan, 2009; Gibson et al., 1998; Lee et al., 2002b; Leung et al., 2008; Marthan, 2004; McFadzean and Gibson, 2002; Putney et al., 2001; Putney and McKay, 1999; Xu and Beech, 2001).

Both ROCC and SOCC are blocked by SKF96365 (Crowley et al., 2002; McFadzean and Gibson, 2002; Merritt et al., 1990), despite this drug is not really specific (Gibson et al., 1998).

2.1.2 Ion exchange through plasma membrane

Extrusion of cytosolic Ca^{2+} is produced by sodium calcium exchangers (NCX) who present low affinity but high capacity for transport of Ca^{2+} . In physiological conditions they operate in normal mode (extracting Ca^{2+} from the cell), but are able to function in a reverse mode and introduce extracellular Ca^{2+} when their equilibrium potential descends under the plasmatic membrane potential (Gómez-Villafuertes et al., 2007), for this to happen, an increase of 10-20 mM in intracytosolic Ca^{2+} is needed (Fameli et al., 2009). Its function is to release Ca^{2+} excess after contraction when $1\mu\text{M}$ concentration is reached, and to allow extracellular Ca^{2+} entry and consequent SR refill in reverse mode (Ashida et al., 1988; Fameli et al., 2007; Karaki et al., 1997; Kuszczak et al., 2010; Lee et al., 2001; Szado et al., 2003; Zhu et al., 1994), which can be inhibited by KB-R7943 (Ladilov et al., 1999).

2.1.3 Active transport to the extracellular space

Calcium is transported actively to the extracellular space by the plasmalemmal calcium ATPase (PMCA) with high affinity but low capacity of calcium transport. Using ATP hydrolysis as energy, for each Ca^{2+} extruded two hydrogens (H^+) entry, so it also has an important intracellular pH regulation function (Akata, 2007a; Brini and Carafoli, 2009; Marin et al., 1999; Pottorf et al., 2000).

2.1.4 Internal mitochondrial and nuclear transport

Calcium transport route to the mitochondrial space is an electrophoretic uniporter with low affinity and high capacity for calcium (Lee et al., 2002a; Marin et al., 1999; McCarron et al., 2006; Orallo, 1996; Sanders, 2001; Somlyo, 1985; Somlyo and Himpens, 1989; Szado et al., 2003; Wray and Burdyga, 2010). The internal mitochondrial membrane has a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ interchange pump for releasing the inside mitochondrial Ca^{2+} excess (McCarron et al., 2006; Orallo, 1996). Mitochondria have an important function in homeostasis, signalling and Ca^{2+}

capture (McCarron et al., 2006; Sward et al., 2002; Szado et al., 2003; Wray and Burdyga, 2010).

Nucleus is surrounded by the SR forming a network contiguous to the nuclear membrane (Avedanian et al., 2010; Wray and Burdyga, 2010). The perinuclear space could function as a Ca^{2+} storing place because its position near the SR lumen (Avedanian et al., 2010; Orallo, 1996) and could have some function in homeostasis (Orallo, 1996).

2.1.5 Active transport to the sarcoplasmic reticulum interior, and calcium binding proteins

The active transport mechanism to the SR is done by the SR Ca^{2+} ATPase (SERCA). It is reversibly inhibited by cyclopiazonic acid (CPA).

There are two theories about how homeostasis is regulated by SR with SERCA and NCX help:

- Superficial buffer barrier (SBB): van Breemen and collaborators in 1995 proposed this hypothesis based on the morphology and location of the SR. This model presents these characteristics:

- (1) A variable fraction of Ca^{2+} entering vascular smooth muscle cells is pumped into a superficially located sarcoplasmic reticulum.
- (2) The supply of extracellular Ca^{*+} through the plasma membrane (PM), in combination with its removal from the submembranal space by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump activity, creates a Ca^{2+} gradient in the peripheral cytoplasm.
- (3) The Ca^{2+} -transporting ATPase of the superficial sarcoplasmic reticulum plays an important role in the complex process of Ca^{2+} extrusion from the vascular smooth muscle.
- (4) Agonists which are able to release Ca^{*+} into the myoplasm will raise the steady-state concentration of myoplasmic Ca^{*+} by short circuiting the SBB.

- Calcium trap: based on the SBB hypothesis, it is based on the fact that in the regions where the SR is apposed to the PM, they could form a passive physical barrier where calcium could stay trapped and could help in SR refilling (Bradley et al., 2004; McCarron et al., 2004; McCarron et al., 2006).

Calcium binding proteins (CBP) are able to couple this ion to a specific part of their molecules in a selective and reversible way with a very fast kinetic (Yáñez et al., 2012). There are several CBPs, including calmoduline (CaM), calcineurine and the internal SR proteins, such as calreticulin (Yáñez et al., 2012). Is estimated that more than 50% of Ca^{2+} is in the SR, is bound to calreticulin (Wray and Burdyga, 2010).

Figure 3: homeostatic maintaining mechanisms.

2.2 Sarcoplasmic reticulum

In 1967 Hurwitz and collaborators postulated the presence of a Ca^{2+} storage organelle in VSMC. Lately using electron microscopy (EM), a membranous system forming tubules and sacks near the cellular periphery and the internal cellular area was observed. They suggested that the SR could be the biggest intracellular Ca^{2+} storage reservoir (Gabella, 1971).

2.2.1 Release channels and internalization calcium pumps

2.2.1.1 Ryanodine channels

The ryanodine receptor (RYR) can produce sudden and large duration Ca^{2+} releases from SR. The channel activates in response to Ryanodine, Ca^{2+} and caffeine, which is used as a release Ca^{2+} inducer from SR (Saida, 1982), releasing it in two phases, a small initial release followed by a regenerative process where Ca^{2+} is released and acts on a RYR group inducing more Ca^{2+} release.

2.2.1.2 Inositol triphosphate activated channels

An agonist binding to the G-protein coupled receptor in smooth muscle leads to phospholipase C (PLC) activation that catalyses the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) into inositol triphosphate (IP₃) and diacylglycerol (DAG) (Berridge and Galione, 1988). IP₃ releases Ca²⁺ from the SR when it couples to the IP₃ activated calcium channels (IP₃R), and DAG activates PKC. IP₃R1 activity can be stimulated when the [Ca²⁺] is lower than 300nM, meanwhile at higher concentrations the release mechanism is inhibited (lino, 2010). The most common inhibitor used is 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) which inhibits the opening without affecting the coupling or synthesis of IP₃ (Wray and Burdyga, 2010).

2.2.1.3 Internalization calcium pumps

Done by SERCA, previously described in 2.1.5.

2.2.2 Sarcoplasmic reticulum calcium release mechanisms

Originally, calcium induced calcium release (CICR) was related to RYR, although it has been observed that IP₃R are also regulated in this way (Marin et al., 1999), while in this case is called IP₃ induced calcium release (IICR) (Akata, 2007a; Orallo, 1996). Various functions have been proposed: agonist induced amplification of calcium signal, calcium oscillation creating, calcium waves initiation and a possible function in the SBB mechanism (Akata, 2007a; Marin et al., 1999)

2.2.3 Sarcoplasmic reticulum elementary signals

When calcium signals that produce calcium oscillations increase their frequency, sometimes are dispersed through the cytoplasm in form of regenerative [Ca²⁺] waves changes (Clapham, 2007), which depend in successive rounds of calcium liberation and diffusion from groups of IP₃Rs or RYRs.

IP₃R groups produce local signals called puffs, meanwhile RYR groups produce calcium sparks (Berridge et al., 2003). These signals are repeated for establishing regular Ca²⁺ oscillations which have been implied in different process control (Berridge et al., 2003). There are two different kinds of Ca²⁺ oscillations (Lee et al., 2002a), asynchronous and synchronic. Asynchronous oscillations may initiate synchronic ones, which produce vasomotion if they continue for a long period of time (Mauban et al., 2001).

The Ca²⁺ refilling oscillatory mechanism is based in the following event sequence, figure 4:

- (1) The initiation and/or modulation of this oscillator depends upon the action of agonists that increase the formation of InsP₃ and diacylglycerol (DAG), both of which promote oscillatory activity.
- (2) The oscillator is very dependent on Ca²⁺ entry to provide the Ca²⁺ necessary to charge up the stores for each oscillatory cycle.
- (3) The entry of external Ca²⁺ charges up the ER to sensitize the RYRs and InsP₃ receptors prior to the next phase of release.
- (4) The mechanism responsible for initiating Ca²⁺ release may depend either on the RYRs or the InsP₃ receptors as we have seen before.
- (5) This initial release of Ca²⁺ is then amplified by regenerative Ca²⁺ release by either the RYRs or InsP₃ receptors, depending on the cell type (Dai et al. 2006; Sanderson et al. 2008).
- (6) The global Ca²⁺ signal then activates contraction.
- (7) The recovery phase depends on the sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA), which pumps some of the Ca²⁺ back into the ER, and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA), that pumps Ca²⁺ out of the cell.
- (8) One of the effects of the released Ca²⁺ is to stimulate Ca²⁺-sensitive K⁺ channels such as the BK channels that will lead to membrane hyperpolarization.
- (9) Another action of Ca²⁺ is to stimulate Ca²⁺-sensitive chloride channels, which result in membrane depolarization to activate the VOCC channels that introduce Ca²⁺ into the cell resulting in further membrane depolarization.

(10) This depolarization can spread to neighbouring cells by current flow through the gap junctions to provide a synchronization mechanism in those cases where the oscillators are coupled together to provide vasomotion (Berridge, 2008).

Figure 4: oscillation formation process and cellular synchronization.

3. VASCULAR SMOOTH MUSCLE TONE REGULATION

3.1 Vascular smooth muscle contraction mechanism

The $[Ca^{2+}]_i$ increase is result of extracellular Ca^{2+} entry and/or its release from intracellular deposits, fundamentally SR. Ca^{2+} binds to the 4 binding sites of calmoduline (CaM), creating the Ca^{2+} -calmoduline complex. This conformation binds to the myosin light chain kinase (MLCK) creating the Ca^{2+} -CaM-MLCK active complex. Once activated, MLCK induces serine 19 phosphorylation from the (20kD) myosin light chain (MLC20). This phosphorylation allows actin binding and myosin ATPase activation, which facilitates contraction (Rembold, 1992; Somlyo and Himpens, 1989; Somlyo and Somlyo, 1994).

3.1.1 Excitation-contraction coupling

In physiological conditions a $[Ca^{2+}]_i$ increase may induce smooth muscle excitation-contraction coupling.

3.1.1.1 Electromechanical coupling

This mechanism implies membrane potential changes in VSMC. When this value turns less negative (depolarization), VOCCs activate producing calcium entry and vasoconstriction (Somlyo and Himpens, 1989). The calcium entry flow activated during depolarization could induce the initiation of the CICR process.

3.1.1.2 Pharmacomechanical coupling

This mechanism is based in an agonist binding to a receptor evoking $[Ca^{2+}]_i$ increase without a previous potential membrane change (Somlyo and Himpens, 1989).

3.1.2 Calcium sensitization contraction

When a higher contraction than the one produced by a specific $[Ca^{2+}]_i$ elevation appears, it is called contractile apparatus Ca^{2+} sensitization or Ca^{2+} sensitization increase (Rembold, 1992; Somlyo and Somlyo, 1994). MLC20 phosphorylation level is determined by the balance between the Ca^{2+} -CaM-MLCK and myosin light chain phosphatase (MLCP) phosphorylation and dephosphorylation processes (Hirano, 2007; Somlyo and Himpens, 1989). Although MLC20 phosphorylation through MLCK is the principal signalling event in the initiation of VSMC contraction, special attention should be paid to the MLCP regulation (Akata, 2007b; Buus et al., 1998; de Godoy and Rattan, 2011; Kimura et al., 1996). Because when MLCP is active, induces MLC20 phosphorylation and consequently vasodilatation.

3.1.2.1 Rho family regulation

ROCK is a specific cytoplasmic threonine serine kinase which serves as RhoA effector (Leung et al., 1995; Matsui et al., 1996). RhoA/ROCK activation is linked to the G-protein activation of the $G_{12/13}$ pathway. When RhoA is activated ROCK migrates to the membrane and interacts with RhoA-GTP activating. Its action mechanism is MLC20 dephosphorylation inhibition by MLCP through subunit MYPT1 phosphorylation at thr696 y thr853 (Akata, 2007b; de Godoy and Rattan, 2011; Hirano, 2007; Wang et al., 2009). There exist some Rho kinase inhibitors such as Y27632 and HA-1077.

Figure 5: vascular smooth muscle contraction mechanism and calcium sensitization. Modified from Matsuo, 2011.

3.2 Vascular smooth muscle relaxation mechanism

VSMC relaxation is produced when $[Ca^{2+}]_i$ decreases under $1\mu M$ at the contractile protein level. This decrease induces Ca^{2+} -CaM-MLCK complex dissociation and inactive MLCK regeneration, which allows MLC20 dephosphorylation through MLCP, inducing relaxation through the inactivation of the actin/myosin complex (Akata, 2007b; Somlyo and Somlyo, 1994).

4. AGEING AND PATHOLOGICAL FACTORS

4.1. Ageing

World population ageing was one of the most important demographic events in the 20th century. Ageing is a slow, passive, general process influenced by multiple genetic and environmental factors (Docherty, 1990). There is great number of ageing manifestations which are not related with disease (Gómez-Pinilla et al., 2006). Nevertheless, it is difficult to separate ageing dependent changes from human pathological problems.

The appearance of ageing related changes lead to a “calcium ageing theory” (Gómez-Pinilla et al., 2007). These changes could be related with calcium homeostasis and cytotoxicity, which are related to degenerative diseases.

4.2 Pathological factors

Some characteristics and diseases are considered cardiovascular risk factors and could induce changes in vascular contractility, in contraction action mechanisms and in calcium homeostasis. Smoking leads to a calcium homeostasis dysfunction. Neoplasia induces specie, experimental procedure, and type of tumour, dependant arterial responses. Signalling pathways and systems and organelles implied in contractility are different between genders (Devynck, 2002). Diabetes mellitus can be defined as a group of metabolic disorders characterised by hyperglycemia. Diabetes affects diverse cellular mechanisms in human arteries, causing vasomotor dysfunction. Diabetes,

obesity and hypertension are intimately related. Obesity is defined by the body mass index. Hypertension is the most common world disease and obesity contributes to its development as diabetes does. Besides that diabetes double the possibilities of developing hypertension and vice versa (Sharabi, 2012). Framingham study reveals that being obese increases a 30% the risk of suffering hypertension (Wilson et al., 2002). Being sedentary, despite not in a direct way, could be considered as another cardiovascular risk.

II. Objectives

In the latest 70's a great scientific interest about the contractile machinery of smooth muscle cell grew (Bremel, 1974; Devine et al., 1972; Gabella, 1971; Hurwitz et al., 1967; Somlyo and Somlyo, 1968). Since then, the characterization of the initiation and maintenance contraction mechanisms has been searched. Studies came more specific, searching for channels (Ashida et al., 1988; Nelson et al., 1990; Pacaud et al., 1991), calcium intracellular movements (Berridge and Galione, 1988; Goldbeter et al., 1990), and sensitization processes (Asano et al., 1989; Rembold, 1990). All those were done separately with experimental animals (Iino et al., 1994; Lee et al., 2002a; Peng et al., 2001; Xia and Khalil, 2009), isolated vascular smooth muscle cells (Avedanian et al., 2010; Otun et al., 1992) and even animal (Ruehlmann et al., 2000) and human (Crowley et al., 2002) veins.

However, these groups of findings were not observed on human arteries.

So, the present thesis objectives proposed were:

1. Clarify and characterise the action mechanisms, through α -adrenergic agonist (phenylephrine) induced contraction is produced in human mesenteric arteries, and the possible ageing and pathologies differences.
2. Determine the existence of intracellular calcium movements, describe and characterise them to prove if contraction depends on them.
3. Prove, depending on the proximity to the plasma membrane, if the contraction process is dependent on intracellular reservoirs, such as sarcoplasmic reticulum.
4. Determine if Rho A, ROCK I and ROCK II expression levels vary with age. Prove if phenylephrine induced myosine light phosphatase chain subunit MYPT1 phosphorylation levels vary with age and through time, and if the Rho kinase inhibitor (HA-1077) induces inhibition of such phosphorylation.

III. Materials and methods

Human mesenteric arteries (MA) from patients undergoing abdominal surgeries were used for these experiments. The tissue was collected in cold RPMI medium and transported to the laboratory. MA from patients aged 17 to 85 were used in this study. The information available from patients is: age, gender, diabetes, sedentary lifestyle, obesity, smoking, hypercholesterolemia, hypertension and neoplasia.

1. VASCULAR REACTIVITY STUDIES

1.1. Dissection, mounting and normalization protocol

For vascular reactivity studies we used the methodology described by Mulvany and Halpern in 1976, with some modifications.

Figure 6: multichannel miograph 610M Danish Myo Technologies (DMT).

Figure 7: artery mounting scheme on the monograph jaws.

Once mounted, the rings are left for stabilization for 30 minutes at 37°C oxygenated with carbogen. Afterwards, the vessels are normalised.

1.2. Experimental protocol

After washing out the rings several times, these are precontracted with a 10µM phenylephrine (phe) dose, and once the contraction is stabilised, each ring is exposed to one of this different drugs:

- Nifedipine (1µM): type L, voltage gated calcium channel blocker. First dilution in methanol, next in distilled water (DDH₂O).
- KB-R7943 (10µM): reverse mode Na⁺/Ca²⁺ exchanger pump inhibitor. Diluted with DMSO.

- SKF-96365 (50 μ M): receptor operated and store operated calcium channel blocker. Diluted with DMSO.
- HA-1077 (50 μ M): Rho kinase inhibitor. Diluted with DDH₂O
- 2-APB (50 μ M): Inositol tri phosphate sarcoplasmic reticulum channel blocker. Diluted with DMSO.
- CPA (1 μ M): sarco/endoplasmatic calcium ATPase inhibitor. Diluted with DMSO.

1.3. Products

1.3.1. Nutrient liquids

1.3.2. Reactives

1.4. Results analysis

Vasodilators maximum relaxation is expressed as percentage of the phe (10 μ M) induced maximum contractile response.

Patients samples are divided in the age groups: young (17-40), adults (41-65) and elderly (66-83). For each treatment, the relaxation percentages are exposed in bar graphs for each group, as mean values and mean standard errors, and a non parametric (data did not show normality at the D'Agostino Pearson test, or were not enough to have it done) Kruskal-Wallis test and Dunns post test were done comparing the age groups. P value < 0,05 is statistically significant.

2. CONFOCAL MICROSCOPY AND VASCULAR REACTIVITY STUDIES

2.1. Dissection, mounting and normalization protocol

Arterial Segments were incubated with Fluo-4 AM for 45 minutes at 37°C. An individual myograph was set on top of a confocal microscope. Rings were mounted and normalised as previously seen in 1.1, figure 8.

Figure 8: A. Confocal microscope, MRC 1024 Biorad. B. Myograph 310 A DMT.

2.2. Experimental protocol

900 cycles (aprox. 1,25 seconds/cycle) video capture was set for each experiment. Once started, after 150 seconds phe 10µM is added to the bath and after 300 seconds one of these drugs is added: nifedipine, HA-1077, 2-APB or CPA. At the same time vascular reactivity is measured with the myograph.

2.3. Products

2.4. Results analysis

Different regions of interest (ROI) which represent different cells from the artery are selected. 10 time points are selected in the video and represented in the graph and as images from the video. Lately, the mean of the 5 ROIs is represented at the same time as the contractility of the artery. The results are explained descriptively through the processes observed for each experiment done for each drug.

3. ELECTRON MICROSCOPY STRUCTURAL STUDY

3.1. Dissection protocol and sample preparation

Samples are introduced as fast as possible in a fixation solution. The rings obtained are washed out and left at 4°C. Next day a post fixation process is done, washed out and a dehydration process with acetone is made previous to embedding of the ring in resins. Finally, the ring embedded in a resin block is left for 8 hours at 60°C. The blocks are taken to the electron microscopy centre where the technicians do the last processing of the sample and cut and prepare samples for electron microscopy observation and image acquisition.

3.2. Imaging protocol

3 Cells are randomly chosen for each patient and images are serially acquired so lately can be used to reconstruct the cells.

At the laboratory, images are linked to for each cell, image process to be seen at pages 53-56 in material y métodos 3.2.

The cell is surrounded following its PM and its length is calculated in pixels.

Images have a 500nm (274,95 pixels) length bar which is divided to obtain a 30nm (16,50 pixels) segment used to measure the maximum separation of SR apposed to the PM (SR-PM). Al the SR selected delimiting by distance to the PM, are measured and their length calculated, obtaining the amount of SR apposed to the PM at a maximal 30nm distance, for each cell.

3.3. Products

3.4. Results analysis

A bar graph is made by representing the mean and standard mean error for the % of SR-PM for each cell of every patient vessel. A Kruskal-Wallis test (no possibility to carry out a normality test by lack of values) followed by

Dunns post test was made to compare the % of SR-PM for each patient represented by the age. P value < 0,05 is statistically significant.

4. RHO A, ROCKS I/II AND P-MYPT1/MYPT1 PROTEIN EXPRESION BY WESTERN BLOTTING

4.1. Obtaining cell protocol

The artery is cleaned in a petri plate and a disaggregation collagenase process is made. Afterwards the liquid with the pieces of artery is centrifuged, and the supernatant is removed. The pellet is resuspended, centrifuged, resuspended again and let in a culture flask F25 (small) for the cells to grow. Once the cells are passed and there are enough grown, the cells are trypsinized, centrifuged and resuspended in freezing medium and frosted in liquid nitrogen.

4.2. Experimental protocol and Western Blotting

To measure RhoA (21 Kd), Rock I and II (160 Kd) expression, untreated cells are used. For P-MYPT1/MYPT1 (140 Kd), cells are also cultured in plates but treated as follows: in a 6-well plate with a replicate for each treatment, in the first plate one well is a control (no treatment), the next one is treated with phe 10 μ M and the last one with phe 10 μ M + HA-1077 50 μ M. The plate is introduced for 7 seconds in the stove at 37°C. The next plates do not have a control but the same treatments, introducing them in the stove for 15 and 30 seconds, and 1 and 5 minutes. Once the plates are taken out of the stove, proteins from the cells are extracted by scratching with lysis buffer. Once the proteins are quantified we can use the cells for western blot.

The first part is electrophoresis, afterward protein transfer, then blockade, primary antibody incubation, secondary corresponding incubation and chemiluminescent detection. For detection of other proteins in the same membrane a stripping process was made.

Smooth muscle β -actine (47 Kd) expression was used as a constitutive protein reference. The protein band measurement was made by densitometry with the computer.

4.3. Products

4.4. Results analysis

Each protein expression is measured in relation to β -actine as a loading control, obtaining a relation numeric value.

For RhoA y ROCK I y II the protein values as mean and standard errors of the mean were represented. For RhoA a Kruskal-Wallis test (no possibility to carry out a normality test by lack of values) followed by Dunns post test was made to compare values between patients.

For the analysis of the phosphorylation of MYPT1 protein, a relation between PMYPT1/ β -actine is done and another for MYPT1/ β -actine. Both relations are opposed to obtain a unique numerical value of the two opposed relations.

To prove if there is a difference in the amount of phosphorylation of protein MYPT1 opposed to non-phosphorilated MYPT1 between patients through age, total protein values as mean and standard errors of the mean for each age were represented, and a Kruskal-Wallis test (data did not show normality at the D'Agostino Pearson test) followed by Dunns post test was made to compare values between patients.

For each patient according to their age, and for all patients as a group, a bar graph representation was made with the phe 10 μ M and phe 10 μ M + HA 50 μ M induced PMYPT1/MYPT1 values as mean and standard errors of the mean. A Kruskal-Wallis test (data did not show normality at the D'Agostino Pearson test or no possibility to carry out a normality test by lack of values) followed by Dunns post test was made to compare phosphorylation at different times with control. Also for each patient according to their age, and for all patients as a group, a paired two ways ANOVA test was made comparing PMYPT1/MYPT1 between times for phe and phe+HA, and afterwards a paired

non parametric test called Friedman test to compare the phosphorylation inhibition effect of phe+HA compared to phe for each time point.

For all analysis P value < 0,05 is statistically significant.

IV. Results

1. VASCULAR REACTIVITY STUDIES

Phenylephrine-induced (10 μ M) contractile mechanism has been studied using different drugs (nifedipine, KBR, SKF, HA, 2-APB y CPA). We also compared differences between the 3 age groups, between gender, habits and pathological factors. 174 rings from 41 patients were used.

Table 1: patients characteristics whose samples were used for this study. By order: gender, age, diabetes, smoker, hypercholesterolemia, hypertension, obesity, sedentary and neoplasia. An x means the patient presented that characteristic.

1.1 2-APB effect

2-APB is an IP₃ channel blocker. There is a smaller blockade in the adult and elderly groups compared to the young group. There is a smaller amount of SR calcium for contraction in this groups and the contraction is maintained by other ways. There is significant difference in the statistical analysis $p=0,0428$, due to the difference between young and elderly groups, figure 9.

*Figure 9: A. 2-APB relaxation % of the 3 groups as mean and standard errors of the mean bar graph representation. * = significant difference $p<0,05$. Numbers inside the bar are rings used. B. Experimental examples of a patient (age between parentheses) from each group with a relaxing % near to his group mean.*

1.2 CPA effect

CPA is a SERCA inhibitor. CPA inhibition is similar between young and elderly groups but there are high standard errors. In adults inhibition is quite small. There are no significant differences between groups. Because of the high standard error we can not make a correct valuation, figures 10 and 11.

Figure 10: CPA relaxation % of the 3 groups as mean and standard errors of the mean bar graph representation. Numbers inside the bar are rings used.

Figure 11: experimental examples of a patient (age between parentheses) from each group with a relaxing % near to his group mean.

1.3 HA effect

This Rho kinase inhibitor induces a practically complete vasodilator effect in all groups, with no significant differences between the effects among the groups, figure 12.

Figure 12: 2-APB relaxation % of the 3 groups as mean and standard errors of the mean bar graph representation. Numbers inside the bar are rings used. B. Experimental examples of a patient (age between parentheses) from each group with a relaxing % near to his group mean.

1.4 KBR effect

KBR inhibits the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger reverse mode. The vasodilator effect produced is reduced according to the group age increase, producing around 80% of relaxation in young group, a 62% in adults group and a 35% in elderly group. So this calcium entry system is bigger in the young group than in the other two. It is significantly different with $p=0,0032$, because of the differences between elderly and young groups, figures 13 and 14.

*Figure 13: KBR relaxation % of the 3 groups as mean and standard errors of the mean bar graph representation. ** = very significant difference $p<0,01$. Numbers inside the bar are rings used.*

Figure 14: experimental examples of a patient (age between parentheses) from each group with a relaxing % near to his group mean.

1.5 Nifedipine effect

Nifedipine is a type L VOCC blocker. We can see that the relaxation induced in every group decreases a 10% while we increase the group age. So young subjects contraction maintenance is more dependant in extracellular calcium entry than adults or elderly. The difference is statistically significant $p=0,0225$ and is due to the difference between young and elderly groups, figure 15.

*Figure 15: A. Nifedipine relaxation % of the 3 groups as mean and standard errors of the mean bar graph representation. * = significant difference $p<0,05$. Numbers inside the bar are rings used. B. Experimental examples of a patient (age between parentheses) from each group with a relaxing % near to his group mean.*

1.6 SKF effect

SKF is a ROCC and SOCC blocker. We observed that these channels have the same function independently of the group age, due to SKF blockade is not different among groups, around 100% relaxation, figures 16 and 17.

Figure 16: SKF relaxation % of the 3 groups as mean and standard errors of the mean bar graph representation. Numbers inside the bar are rings used.

Figure 17: experimental examples of a patient (age between parentheses) from each group with a relaxing % near to his group mean.

1.7 Vasodilators possible effects due to gender and patients pathologies

Values shown in table 2 are the relaxing % of each vasodilator used. And also, the relaxation % that could produce each vasodilator in a patient, depending on the group of age to which corresponds, for one unique characteristic (age,

gender, diabetes, sedentary, etc...). Due to the high standard errors that present the majority of means, and that there are characteristics with none or only one value, it is difficult to give a correct evaluation of the differences in gender, habits or pathologies defined, despite some tendencies are observed.

Table 2: gender and possible pathologies patients could suffer % of relaxation means for each vasodilator depending on the group ages, are shown in the table. Where n is the number of patients who had those characteristics.

2. CONFOCAL MICROSCOPY AND VASCULAR REACTIVITY STUDIES

We studied calcium role in the vascular contractility mechanism of action. So we measured phe induced contractility and calcium fluorescence at the same time. The action mechanism is characterized by CPA, 2-APB, nifedipina and HA addition. We used 14 rings from 7 patients.

Table 3: patients characteristics whose samples were used. By order: gender, age, diabetes, smoker, hypercholesterolemia, hypertension, obesity, sedentary and neoplasia. An x means the patient had one of those characteristics.

2.1 2-APB effect

Phe induces a contraction preceded by an increase in $[Ca^{2+}]_i$, that produces 3 peaks and later decreases to basal $[Ca^{2+}]_i$ and oscillations start. After adding 2-APB contraction decreases slowly and oscillations amplitude and frequency reduces almost until disappear. $[Ca^{2+}]_i$ finally lowers under basal levels, figure 18.

Figure 18: artery force and figure 19 5 cells phe induced fluorescence mean experimental graph through time, and 2-APB effect on both.

Oscillations observed in each cell are synchronized between cells, despite some variations such as individual oscillations, changes in frequency and amplitude and time displacements in oscillations because of calcium wave movement through the artery can be observed between cells, figures 19 and 20.

Figure 19: phe-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations of 5 different cells through time confocal microscopy video graphical representation and 2-APB effect. Numbers represent selected time points of the photographs.

Figure 20: confocal microscopy video photographs of the time points shown in figure 19. Numbers in boxes indicate the cell in figure 19.

2.2 CPA effect

Phe-induced contraction is evoked by a marked elevation of $[Ca^{2+}]_i$ that decays and stays over basal $[Ca^{2+}]_i$. Afterward different amplitude and frequency oscillations start. After CPA addition contraction is not affected but after 5 minutes oscillations practically disappear and $[Ca^{2+}]_i$ almost decays to basal level, figure 21.

Figure 21: artery force and figure 22 5 cells phe induced fluorescence mean experimental graph through time, and CPA effect on both.

The few previous phe precontraction oscillations observed are different among cells therefore asynchronous but very weak. Once stimulated, cells synchronise despite differences in amplitude or frequency, or different oscillations, are observed between cells, figures 22 and 23.

Figura 22: phe-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations of 5 different cells through time confocal microscopy video graphical representation and CPA effect. Numbers represent selected time points of the photographs.

Figura 23: confocal microscopy video photographs of the time points shown in figure 22. Numbers in boxes indicate the cell in figure 22.

2.3 HA effect

Phe-induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ and a subsequent contraction. The initial peak decreases slowly to basal level and increases again due to big amplitude oscillations. Once HA is added, after a pair of minutes relaxation is complete and $[Ca^{2+}]_i$ decreases even under basal levels, recovering afterward, figure 24.

Figure 24: artery force and figure 25 5 cells phe induced fluorescence mean experimental graph through time, and HA effect on both.

Just cell 1 shows oscillations previous to the phe induced main $[Ca^{2+}]_i$ oscillation. Which induces $[Ca^{2+}]_i$ synchronization among cells despite is displaced in time between cells. There are mainly two big increases in $[Ca^{2+}]_i$ that show small oscillations, despite some different small oscillations are observed between cells. HA diminish $[Ca^{2+}]_i$ to basal level and virtually erases the oscillations, figures 25 and 26.

Figure 25: phe-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations of 5 different cells through time confocal microscopy video graphical representation and HA effect Numbers represent selected time points of the photographs.

Figura 26: confocal microscopy video photographs of the time points shown in figure 25. Numbers in boxes indicate the cell in figure 25.

2.4 Nifedipine effect

Phe-induces two small increases in $[Ca^{2+}]_i$ that produces a small contraction. Afterwards a higher increase produces a bigger contraction. Despite there are not to many oscillations, $[Ca^{2+}]_i$ remains at the level of the first increase.

After 5 minutes from nif addition, the relaxing effect is observed and the $[Ca^{2+}]_i$ descends under basal level, without recovery, figure 27.

Figure 27: artery force and figure 28 5 cells phe induced fluorescence mean experimental graph through time, and nif effect on both.

There are practically no oscillations previous to the small ones induced by phe which follows the main $[Ca^{2+}]_i$ increase. A small descend is observed but scarce oscillations. Nif reduces $[Ca^{2+}]_i$ under basal levels without recovery, figures 28 and 29.

Figure 28: phe-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations of 5 different cells through time confocal microscopy video graphical representation and nif effect. Numbers represent selected time points of the photographs.

Figure 29: confocal microscopy video photographs of the time points shown in figure 28. Numbers in boxes indicate the cell in figure 28.

3. ELECTRON MICROSCOPY STRUCTURAL STUDY

We wanted to prove if different aged patients had differences in the amount of SR apposed to PM at a maximum 30nm established distance, figures 30B and 31 A and B. We used 33 rings from 11 patients, 3 from each.

Table 4: patients characteristics whose samples were used for this study. By order: gender, age, diabetes, smoker, hypercholesterolemia, hypertension, obesity, sedentary and neoplasia. An x means the patient presented that characteristic.

There were no statistically significant differences, $p= 0,4405$, between patients in % of SR-PM, figure 30. The % of SR-PM obtained as all arteries from all patients means and means standard errors is $13,5 \pm 0,93 \%$.

Figure 30: A. % of SR-PM as mean and mean standard errors of 3 cells from each patient by age bar graph. B. 28 year old patient cell measurement process image.

Figure 31: A. 49 year old patient cell measurement process image. B. 79 year old patient cell measurement process image.

4. RHO A, ROCKS I/II AND P-MYPT1/MYPT1 PROTEIN EXPRESION BY WESTERN BLOTTING

6 different aged patients cells were used to quantify RhoA (n=4) and ROCKs (n=2) protein expression.

P-MYPT1/MYPT1 protein quantification was made in the same 6 patients. Proving if there is any difference in the P-MYPT1/MYPT1 relation between ages and in phe induced phosphorylation in each patient, and at different time points, and also HA effect for each phosphorylation at each time point. A n=6 was used for patients aged 17, 35 and 77, a n=4 for patients aged 53, 62 and 85.

Table 5: patients characteristics whose samples were used. By order: gender, age, diabetes, smoker, hypercholesterolemia, hypertension, obesity, sedentary and neoplasia. An x means the patient had one of those characteristics.

4.1 Rho A, ROCK I and II expression

4.1.1 Rho A expression

Statistical analysis showed a $p=0,015$ due to the big difference in Rho A expression between patient aged 35 and patients aged 77 and 85 who seem to express les amount of Rho A than the other younger patients, figure 32.

*Figure 32: A. Rho A and loading control representative western blot images. B. Rho A expression as mean and mean standard error according to each patients age. ** = very significant difference $p < 0,01$.*

4.1.2 ROCK I and II expression

Both ROCK I and II expression seem to be higher in younger patients compared to adults and higher in these ones compared to elderly patients. ROCK I expression is higher than ROCK II in almost all of patients, figure 33.

Figure 33: A. ROCK I and II and their respective loading controls representative western blot images. B. ROCK I and II expression as mean and mean standard error according to each patients age.

4.2 P-MYPT1/MYPT1 expression

4.2.1 PMYPT1/MYPT1 expression through age

We prove phe-induced phosphorylation according to each patient age by PMYPT1/MYPT1 expression, and was statistically significant with $p = 0,001$. It was highly significant between 17 years old patient and 85 one, and very significant between the 62 years old patient and the 85 one, figure 34.

*Figure 34: PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error according to each patients age. ** = very significant difference $p < 0,01$. *** = highly significant difference $p < 0,001$.*

4.2.2 17 years old PMYPT1/MYPT1 expression

There is no interaction between time and treatment, neither both produce differences in PMYPT1/MYPT1. Also, there are no differences in phe-induced PMYPT1/MYPT1 phosphorylation between time-points and control (time 0). Although at 15 and 60 seconds there is an increase, in all time points it is

maintained or increased for 5 minutes but not significantly. HA inhibition was just significantly different at 60 seconds, despite it seems there is a tendency to reduce phosphorylation as time increases, figures 35 and 36.

Figure 35: phe and phe+HA induced phosphorylation of P-MYPT1 and MYPT1 as time increases representative western blot image. Phe+HA is represented as +HA in the figure.

*Figure 36: phe and phe+HA induced PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error of a 17 years old patient according to several time points. * = significant difference $p < 0,05$.*

4.2.3 35 years old PMYPT1/MYPT1 expression

There is no interaction between time and treatment, neither both produce differences in PMYPT1/MYPT1. Also, there are no differences in phe-induced PMYPT1/MYPT1 phosphorylation between time-points and control (time 0), and in all time points it is maintained or increased for 5 minutes but not significantly. HA inhibition was significantly different at 30 and 60 seconds, despite it seems there is a tendency to reduce phosphorylation as time increases, figures 37 and 38.

Figure 37: phe and phe+HA induced phosphorylation of P-MYPT1 and MYPT1 as time increases representative western blot image. Phe+HA is represented as +HA in the figure.

*Figure 38: phe and phe+HA induced PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error of a 35 years old patient according to several time points. * = significant difference $p < 0,05$.*

4.2.4 52 years old PMYPT1/MYPT1 expression

There is no interaction between time and treatment, neither treatment produce differences in PMYPT1/MYPT1, but time does modify the results with a

$p=0,0153$. Also, there are no differences in phe-induced PMYPT1/MYPT1 phosphorylation between time-points and control (time 0), and in all time points it is maintained or slightly decreased for 5 minutes but not significantly. HA inhibition was significantly different at 300 seconds, despite it seems there is a tendency to reduce phosphorylation as time increases, figures 39 and 40.

Figure 39: phe and phe+HA induced phosphorylation of P-MYPT1 and MYPT1 as time increases representative western blot image. Phe+HA is represented as +HA in the figure.

*Figure 40: phe and phe+HA induced PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error of a 52 years old patient according to several time points. * = significant difference $p<0,05$.*

4.2.5 62 years old PMYPT1/MYPT1 expression

There is no interaction between time and treatment, but treatment ($p=0,0017$) and time ($p=0,0004$) produce separately, differences in PMYPT1/MYPT1. Also, there are no differences in phe-induced PMYPT1/MYPT1 phosphorylation between time-points and control (time 0), and despite the increases at times 7 and 15 seconds, in all time points it is maintained for 5 minutes but not significantly. HA inhibition was significantly different at 15 seconds, despite it is clear that phosphorylation is inhibited as time increases, figures 41 and 42.

Figure 41: phe and phe+HA induced phosphorylation of P-MYPT1 and MYPT1 as time increases representative western blot image. Phe+HA is represented as +HA in the figure.

*Figure 42: phe and phe+HA induced PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error of a 62 years old patient according to several time points. ** = very significant difference $p<0,01$.*

4.2.6 77 years old PMYPT1/MYPT1 expression

There is no interaction between time and treatment, but treatment ($p=0,0356$) produces differences in PMYPT1/MYPT1, and time do not. Also, there are no differences in phe-induced PMYPT1/MYPT1 phosphorylation between time-points and control (time 0), and despite the increases at time 7 seconds, in all time points it is maintained for 5 minutes but not significantly. HA inhibition was significantly different at 15 seconds, despite it is generally observed a slightly phosphorylation inhibition compared to those not treated with HA, figures 43 and 44.

Figure 43: phe and phe+HA induced phosphorylation of P-MYPT1 and MYPT1 as time increases representative western blot image. Phe+HA is represented as +HA in the figure.

*Figure 44: phe and phe+HA induced PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error of a 77 years old patient according to several time points. ** = very significant difference $p<0,01$.*

4.2.7 85 years old PMYPT1/MYPT1 expression

There is no interaction between time and treatment, but treatment ($p=0,0073$) produces differences in PMYPT1/MYPT1, and time do not. Also, there are no differences in phe-induced PMYPT1/MYPT1 phosphorylation between time-points and control (time 0), and in all time points it is maintained or increased for 5 minutes but not significantly. HA inhibition was significantly different at 15 seconds, and very significant at 30 seconds, also it is observed that phosphorylation is inhibited as time increases, figures 45 and 46.

Figure 45: phe and phe+HA induced phosphorylation of P-MYPT1 and MYPT1 as time increases representative western blot image. Phe+HA is represented as +HA in the figure.

*Figure 46: phe and phe+HA induced PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error of a 85 years old patient according to several time points. * = significant difference $p < 0,05$. ** = very significant difference $p < 0,01$.*

4.2.8 All patients group PMYPT1/MYPT1 expression

There is interaction between time and treatment and either time ($p=0,0347$) and treatment ($p < 0,0001$) induces modifications in PMYPT1/MYPT1. Also, there are no differences in phe induced PMYPT1/MYPT1 phosphorylation between times and control (time 0). Although the increase observed at 15 seconds, in all time points it is maintained or increased for 5 minutes but not significantly. HA inhibition was significantly different at 7 seconds, and highly significant at the rest of time points, so it is clearly observed that phosphorylation is inhibited as time increases, figure 47.

*Figure 47: phe and phe+HA induced PMYPT1/MYPT1 expression as mean and mean standard error of all patients as a group according to several time points. * = significant difference $p < 0,05$. *** = highly significant difference $p < 0,001$.*

V. Discussion

1. VASCULAR REACTIVITY STUDIES

We determined the human mesenteric artery contraction mechanisms of action induced by the α -adrenergic vasoconstrictor phenylephrine. In addition, we studied if these mechanisms were modified by ageing.

There is an extracellular calcium entry in the artery contraction process, which is less important in elderly than in young subjects, despite in rat mesenteric artery, relaxation is similar among ages (Rubio et al., 2002). This could happen due to a different VOCC expression, that do not happen in mice VSMCs (del Corso et al., 2006), to an impairment in elderly channels or to a lower VOCC sensitivity to dihydropyridines.

When inhibiting contraction with SKF, we observed a 100% relaxation in all age groups (figures 16 and 17), as it happens with mouse anococcygeus muscle (Wayman et al., 1996). Some studies suggest that SKF blocks ROCC and SOCC, and could also block VOCC (Lagaud et al., 1999; Merritt et al., 1990; Zholos et al., 2000). This could be happening in our experiments because when inhibiting VOCC with nifedipine there is less relaxation than when doing so with SKF, inducing higher relaxation, as it happens in pig prostatic artery (Sanchez et al., 2010). We suggest a capacitative calcium entry in arterial contraction that could have a secondary SR refilling function.

This refilling function is sometimes mediated by calcium entry through NCX reversal mode. In our observations, the NCX reversal mode inhibitor KBR, produced an 80% relaxation as mean in the young group and a 35% in the elderly group (figures 13 and 14). The relaxation percentage observed in young subjects is similar to the one observed in human bronchial muscle (Dai et al., 2007) and in rabbit inferior cava vein (Lee et al., 2001), despite it was not the same in rat pulmonary artery (Chau et al., 2003). So, we can suggest that the refilling process is dependent on animal specie and tissue investigated, and that in human mesenteric arteries it affects the SR refilling in a stronger manner in young subjects than in elderly ones.

Our CPA results are not conclusive (figures 10 and 11). In other species and tissues it has been observed that CPA 10 μ M induces relaxation (Dai et al., 2007) and in rat pulmonary artery a complete relaxation of a noradrenalin-

induced contraction when preincubating with CPA takes place (González De La Fuente et al., 1995). This suggests that our results are due to the low CPA concentration used (1 μ M) or to a small number of samples, among other factors. With regard to 2-APB, when adding it to an acetylcholine precontraction a 95% relaxation was observed in rat uterus tissue, (Ascher-Landsberg et al., 1999), whereas a 80% relaxation was reached in rat penile artery (Villalba et al., 2007). In our experiments we observed that 2-APB relaxation in the young group was near to a 100%, while as we passed to older groups that relaxation decreased (figure 9). Similar to SKF, some authors have described the capacity of 2-APB to act directly on the capacitative calcium entry channels during relaxation, even without involving IP₃R (Braun et al., 2001), which could be the reason of the ageing relaxation reduction, although that line of research falls out of the scope of the present thesis. We suggest that the SR has a crucial role in arterial contractility due to the release of calcium to the intracellular space from IP₃R. Despite being SERCA the only SR calcium recapture system, we can not ensure that the refilling is functional and that this release could be maintained through a long time, as suggested by other groups.

To prove Rho kinase calcium sensitizing during contraction, we used the inhibitor HA-1077 which induced a complete relaxation in all groups (figure 12). As was proved in rabbit thoracic artery (Sakurada et al., 2003), and human saphenous vein (Crowley et al., 2002). This suggests that RhoA/ROCKs sensitizing mechanism has an important role in human mesenteric arteries contraction.

2 y 3. CONFOCAL MICROSCOPY WITH VASCULAR REACTIVITY STUDY. AND ELECTRON MICROSCOPY STUDY

We wanted to know if contraction was dependent on intracellular concentration calcium movements ($[Ca^{2+}]_i$) and how these affected the cells and the artery. These studies were complemented with an electron microscopy study, as described below.

In a descriptive way, phe induced an initial transient $[Ca^{2+}]_i$ increase that can further decrease and produce low amplitude and frequency oscillations, or be maintained and produce even less amplitude and frequency oscillations. Oscillation frequency is dependent of the agonist concentration (Mauban et al., 2001; Peng et al., 2001; Ruehlmann et al., 2000; Sell et al., 2002). With the high phe concentration we used, the oscillations we observed were synchronic and we did not observe vasomotion in almost any case. Peng and collaborators in 2001 prove that the maximum concentration induced maximum tension and vasomotion disappeared, while at lower concentrations oscillations were asynchronic (Iino et al., 1994; Miriel et al., 1999; Ruehlmann et al., 2000) and presented vasomotion. On the contrary other groups observed, that maximal concentration induced vasomotion (Mauban et al., 2001), although synchronization was not considered as the unique reason for vasomotion development (Schuster et al., 2004), as assessed in our experiments.

We used 2-APB to check if oscillations were IP_3R -dependent, observing that the vessel relaxed and oscillations were reduced in number until almost disappear (figures 18,19 and 20), as it happens in rat mesenteric arteries (Lamont y Wier, 2004) and guinea-pig gastric smooth muscle (Fukuta et al., 2002). With these data we can suggest that oscillations are due to IP_3R calcium release.

Oscillations could depend on the SR refilling capacity. In order to assess that question we used CPA for our study, observing that oscillations reduced and almost disappeared (figures 21, 22 and 23), as it does in human bronchial muscle (Dai et al., 2007) and pig retinal arteries (Misfeldt et al., 2010), despite contractility hardly reduced. It could happen that CPA at a lower concentration produces a weaker effect or it takes place during a longer period of time than used in our experiments.

For the refilling process to occur a scarce separated tight zone between SR and PM is needed (Fameli et al., 2007). Its wideness should be 40-50nm so the calcium loss to the cytosol is sufficiently small for guaranteeing the SR refilling process (Lee et al., 2005) through SERCA, being between 10-15% the SR-PM % in a cell for a correct refill (Lee et al., 2002a). When we measured our cells (figures 30B and 31), the SR-PM % at a maximum distance of 30nm was approximately a mean of 13%, confirming these studies and proving that these

refilling process take place in our vessel model (figure 30A). We have also observed that this SR-PM percentage is similar among age groups. Therefore, age-dependent SR disappearance or separation from PM and subsequent loss of oscillations postulated by other groups (Lee et al., 2005) has not been observed in our experiments.

Nifedipine produces asynchronous oscillations and $[Ca^{2+}]_i$ reduction (Dai et al., 2007; Kuo et al., 2003; Lee et al., 2001; Lee et al., 2002b). Peng and collaborators (2001) prove that calcium entry through VOCC was not necessary for oscillation initiation but it was for synchronization and vasomotion, and that VOCC inhibition produced a loss of synchronization and asynchronous oscillation appearance. In our case, in human arteries, we observed that synchronic oscillations disappeared and $[Ca^{2+}]_i$ diminished even under the basal level (figures 27, 28 and 29), as it was seen in pig retinal arteriole (Misfeldt et al., 2010). Therefore, calcium entry through VOCC is necessary for the maintenance of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations during human mesenteric arteries contraction process.

When adding HA-1077 we obtained a complete relaxation, $[Ca^{2+}]_i$ decreased to basal level and oscillations practically disappeared (figures 24, 25 and 26), suggesting that the Rho kinase pathway is involved in the $[Ca^{2+}]_i$ oscillatory process in our arteries.

4. RHO A, ROCKS I/II AND P-MYPT1/MYPT1 PROTEIN EXPRESSION BY WESTERN BLOTTING

RHO A/ROCK I and II protein expression levels was measured in human VSMC from patients of different ages. We aimed to check whether there was any difference in such expression that could suppose a higher or lower age dependent contractile process sensitization, or if it was similar in all patients. There are RHO A and ROCKs expression studies in rat penis that indicate that the protein levels are similar in young and elderly rats (Jin et al., 2006), while in other studies such as guinea-pig bladder, those proteins expression were reduced by ageing (Gómez-Pinilla et al., 2008), as we could observe in our studies, where the amount of RHO A and ROCKs expression showed a tendency

to reduce during ageing (figures 32 and 33). This could indicate that during the contractile process, calcium sensitization in older subjects is lower and/or functionally impaired.

In PMYPT1/MYPT1 expression measures we checked if that ratio was modified by patients age (figure 34), and we observed that differences between the younger and older subjects were high. In the guinea-pig bladder study explained above (Gómez-Pinilla et al., 2008), they obtained similar results, suggesting that ageing produces differences in MYPT1 phosphorylation in response to a stimuli. We can suggest with our data that ageing reduces MYPT1 at Thr853 phosphorylation induced by Rho kinase.

We wanted to know if phosphorylation is a fast process or is maintained along time, and we checked it in all patients separately. In a study with rabbit basilar artery it was observed that in response to endothelin 1 there was a trend for MYPT1 phosphorylation to increase at one minute and stay during 5 minutes from the stimulus (Kikkawa et al., 2012). Similar results were obtained in rabbit femoral artery phe-induced phosphorylation (Dimopoulos et al., 2007). Our results show a high variability among patients, so we did not observe statistically significant differences, but practically in all of our patients phe-induced a trend towards higher phosphorylation at some time-point compared to control (time 0). Similar results were obtained in rabbit femoral artery, where MYPT1 phosphorylation increased after stimulation with phe, (Dimopoulos et al., 2007). After analysis of pooled results from all our patients, we observed a trend towards increase in phosphorylation at 15 seconds, while the rest time-points stayed as control (figure 47).

Finally, we checked the Rho kinase inhibitor HA-1077 effect adding it to all time-points in all patients and again we found great variability in each patient showing significant inhibitions at different time-point between them. However, they all showed a clear tendency to inhibition at all time-points despite it is not statistically significant. Nevertheless, when we pooled results from all patients (figure 47), inhibition induced by HA was significant at time 7 seconds and highly significant on the rest of time-points. This agrees with the high MYPT1 phosphorylation inhibition induced by HA in human thoracic artery stimulated by serotonin (Kandabashi et al., 2002).

Although with our data we cannot confirm that phe-induces MYPT1 phosphorylation compared to control, it seems that it could happen at 15 seconds despite is a non statistically significant result. We suggests the possibility that MYPT1 phosphorylation is part of the basal vessel contraction, as it appears in all the control time-point of every patient, and because Rho kinase inhibitor HA-1077, induces a clear phosphorylation inhibition at each time-point.

VI. Conclusions

1. The contraction process in human mesenteric arteries is mediated by extracellular calcium entry through voltage-gated calcium channels, and it is higher in young than in elderly patients. Also by calcium entry through receptor-operated calcium channels, and capacitance calcium channels.

2. Sarcoplasmic reticulum, mediates contraction process in these arteries. Sarcoplasmic reticulum inositol triphosphate-operated channels are part of this process by opening and calcium release from the reticulum. Such release is higher in young than in elderly patients.

3. Sarcoplasmic reticulum refilling can be done through the calcium sarcoplasmic reticulum ATPase (SERCA), which captures calcium from the sodium calcium exchanger reverse mode calcium entry, which functionality is affected by ageing.

4. Calcium desensitization mechanism mediated by Rho A, ROCK I and II has an important role in human mesenteric arteries relaxation.

5. Phenylephrine induces in human mesenteric arteries an elevated intracellular calcium concentration increase, which transforms into calcium intracellular concentration oscillations, synchronic between cells.

6. From the intracellular calcium concentration increase, a phasic arterial contraction appears which transforms into a tonic contraction which is maintained by intracellular calcium concentration oscillations. Such oscillations are dependent on extracellular calcium entry by voltage-gated calcium channels, receptor-operated calcium channels, by the entry through capacitance calcium entry process, by calcium release from sarcoplasmic reticulum aperture of inositol triphosphate channels, and by calcium sensitization Rho kinase pathway.

7. Human mesenteric arteries present an amount of sarcoplasmic reticulum apposed to the plasma membrane sufficient to produce an effective sarcoplasmic reticulum refill, which is not age-dependent.

8. Proteins involved in calcium sensitization Rho kinase pathway Rho A, ROCK I and ROCK II expression, present a tendency to decrease through ageing. Also, myosin light chain phosphatase subunit MYPT1 expression presents a tendency to diminish in very advanced ages.

9. MYPT1 phosphorylation expression for each time point observed is inhibited by the Rho kinase inhibitor HA-1077, and this inhibition is higher as time increases. MYPT1 phosphorylation inhibition by HA-1077 takes place in samples from patients of all ages.

10. As a summary: the human arteries contraction process is dependent on extracellular and sarcoplasmic reticulum calcium, and some of the contractile mechanisms involved are modified by ageing. The calcium intracellular movements that conforms the contractile process are synchronised oscillations. The contraction process can be affected by calcium sensitization which could be age dependent, while in the relaxing process, desensitization has a important role.

VII. Bibliografía/References

- Akata T (2007a) Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth* **21**:220-231.
- Akata T (2007b) Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 2: regulatory mechanisms modulating Ca²⁺ mobilization and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity in vascular smooth muscle cells. *J Anesth* **21**:232-242.
- American Diabetes A (2010) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **33**:S62-S69.
- Asano T, Suzuki T, Tsuchiya M, Satoh S, Ikegaki I, Shibuya M, Suzuki Y and Hidaka H (1989) Vasodilator actions of HA1077 in vitro and in vivo putatively mediated by the inhibition of protein kinase. *Br J Pharmacol* **98**:1091-1100.
- Ascher-Landsberg J, Saunders T, Elovitz M and Phillippe M (1999) The effects of 2-aminoethoxydiphenyl borate, a novel inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor modulator on myometrial contractions. *Biochem Biophys Res Commun* **264**:979-982.
- Ashida T, Schaeffer J, Goldman WF, Wade JB and Blaustein MP (1988) Role of sarcoplasmic reticulum in arterial contraction: comparison of ryanodines's effect in a conduit and a muscular artery. *Circ Res* **62**:854-863.
- Avedanian L, Jacques D and Bkaily G (2010) Presence of tubular and reticular structures in the nucleus of human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* **50**:175-186.
- Barja G (1998) Mitochondrial free radical production and aging in mammals and birds. *Ann N Y Acad Sci* **854**:224-238.
- Berridge MJ (2008) Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* **586**:5047-5061.

Berridge MJ (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1793**:933-940.

Berridge MJ, Bootman MD and Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:517-529.

Berridge MJ and Galione A (1988) Cytosolic calcium oscillators. *FASEB J* **2**:3074-3082.

Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z and Cassis LA (2007) Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* **31**:1652-1659.

Bradley KN, Craig JW, Muir TC and McCarron JG (2004) The sarcoplasmic reticulum and sarcolemma together form a passive Ca²⁺ trap in colonic smooth muscle. *Cell Calcium* **36**:29-41.

Braun FJ, Broad LM, Armstrong DL and Putney JW, Jr. (2001) Stable activation of single Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels in divalent cation-free solutions. *J Biol Chem* **276**:1063-1070.

Bremel RD (1974) Myosin linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle. *Nature* **252**:405-407.

Brini M and Carafoli E (2009) Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* **89**:1341-1378.

Buchholz J, Tsai H, Foucart S and Duckles SP (1996) Advancing age alters intracellular calcium buffering in rat adrenergic nerves. *Neurobiol Aging* **17**:885-892.

Burt RP, Chapple CR and Marshall I (1995) The role of capacitative Ca²⁺ influx in the alpha 1B-adrenoceptor-mediated contraction to phenylephrine of the rat spleen. *Br J Pharmacol* **116**:2327-2333.

- Buus CL, Aalkjaer C, Nilsson H, Juul B, Moller JV and Mulvany MJ (1998) Mechanisms of Ca²⁺ sensitization of force production by noradrenaline in rat mesenteric small arteries. *J Physiol* **510** (Pt 2):577-590.
- Bye A, Sorhaug S, Ceci M, Hoydal MA, Stolen T, Heinrich G, Tjonna AE, Najjar SM, Nilsen OG, Catalucci D, Grimaldi S, Contu R, Steinshamn S, Condorelli G, Smith GL, Ellingsen O, Waldum H and Wisloff U (2008) Carbon monoxide levels experienced by heavy smokers impair aerobic capacity and cardiac contractility and induce pathological hypertrophy. *Inhal Toxicol* **20**:635-646.
- Cabrera Fischer EI (2008) La adventicia: estado actual del conocimiento. *Rev argent cardiol [online]* **76**:58-63.
- Cahalan MD (2009) STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nat Cell Biol* **11**:669-677.
- Casteels R and Droogmans G (1981) Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells or rabbit ear artery. *J Physiol* **317**:263-279.
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**:1047-1058.
- Costa G (1995) Contracción de los músculos cardíaco y liso, in *Fisiología Veterinaria* (Sacristán AG ed) pp 54-65, MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S.A.
- Crowley CM, Lee CH, Gin SA, Keep AM, Cook RC and Van Breemen C (2002) The mechanism of excitation-contraction coupling in phenylephrine-stimulated human saphenous vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**:H1271-1281.
- Chau WH, Lee WH, Lau WH, Kwan YW, Au AL and Raymond K (2003) Role of Na⁺/H⁺ exchanger in acetylcholine-mediated pulmonary artery contraction of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* **464**:177-187.

- Chauhan SD, Nilsson H, Ahluwalia A and Hobbs AJ (2003) Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:1426-1431.
- Cheng H and Lederer WJ (2008) Calcium sparks. *Physiol Rev* **88**:1491-1545.
- Dagnino-Acosta A and Guerrero-Hernandez A (2009) Variable luminal sarcoplasmic reticulum Ca(2+) buffer capacity in smooth muscle cells. *Cell Calcium* **46**:188-196.
- Dai JM, Kuo KH, Leo JM, Pare PD, van Breemen C and Lee CH (2007) Acetylcholine-induced asynchronous calcium waves in intact human bronchial muscle bundle. *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**:600-608.
- Dai JM, Sytyong H, Navarro-Dorado J, Redondo S, Alonso M, van Breemen C and Tejerina T (2010) A comparative study of alpha-adrenergic receptor mediated Ca(2+) signals and contraction in intact human and mouse vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* **629**:82-88.
- de Godoy MA and Rattan S (2011) Role of rho kinase in the functional and dysfunctional tonic smooth muscles. *Trends Pharmacol Sci* **32**:384-393.
- del Corso C, Ostrovskaya O, McAllister CE, Murray K, Hatton WJ, Gurney AM, Spencer NJ and Wilson SM (2006) Effects of aging on Ca²⁺ signaling in murine mesenteric arterial smooth muscle cells. *Mech Ageing Dev* **127**:315-323.
- Devine CE, Somlyo AV and Somlyo AP (1972) Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. *J Cell Biol* **52**:690-718.
- Devynck MA (2002) Gender and vascular smooth muscle cells: a direct influence on Ca²⁺ handling? *J Hypertens* **20**:2139-2140.

- Dimopoulos GJ, Semba S, Kitazawa K, Eto M and Kitazawa T (2007) Ca²⁺-dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circ Res* **100**:121-129.
- Doadrio Villarejo A (2009) Las redes de señales intracelulares, in *Monografía XXIV Redes de señalización y estrategias terapéuticas* pp 69-96, Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid.
- Docherty JR (1990) Cardiovascular responses in ageing: a review. *Pharmacol Rev* **42**:103-125.
- Doi S, Damron DS, Horibe M and Murray PA (2000) Capacitative Ca(2+) entry and tyrosine kinase activation in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**:L118-130.
- Dreja K, Nordstrom I and Hellstrand P (2001) Rat arterial smooth muscle devoid of ryanodine receptor function: effects on cellular Ca(2+) handling. *Br J Pharmacol* **132**:1957-1966.
- Esfandiarei M, Lam JT, Yazdi SA, Kariminia A, Dorado JN, Kuzeljevic B, Syyong HT, Hu K and van Breemen C (2010) Diosgenin modulates vascular smooth muscle cell function by regulating cell viability, migration, and calcium homeostasis. *J Pharmacol Exp Ther* **336**:925-939.
- Fameli N, Kuo KH and van Breemen C (2009) A model for the generation of localized transient [Na⁺] elevations in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **389**:461-465.
- Fameli N, van Breemen C and Kuo KH (2007) A quantitative model for linking Na⁺/Ca²⁺ exchanger to SERCA during refilling of the sarcoplasmic reticulum to sustain [Ca²⁺] oscillations in vascular smooth muscle. *Cell Calcium* **42**:565-575.

- Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ and Nakano T (1999) Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* **274**:37385-37390.
- Ferrero E, Labalde M, Fernandez N, Monge L, Salcedo A, Narvaez-Sanchez R, Hidalgo M, Dieguez G and Garcia-Villalon AL (2008) Response to endothelin-1 in arteries from human colorectal tumours: role of endothelin receptors. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**:1602-1607.
- Fukuta H, Kito Y and Suzuki H (2002) Spontaneous electrical activity and associated changes in calcium concentration in guinea-pig gastric smooth muscle. *J Physiol* **540**:249-260.
- Gabella G (1971) Caveolae intracellulares and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *J Cell Sci* **8**:601-609.
- Ganitkevich VY and Isenberg G (1991) Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. *J Physiol* **435**:187-205.
- Giachini FR, Lima VV, Filgueira FP, Dorrance AM, Carvalho MH, Fortes ZB, Webb RC and Tostes RC (2012) STIM1/Orai1 contributes to sex differences in vascular responses to calcium in spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* **122**:215-226.
- Gibson A, McFadzean I, Wallace P and Wayman CP (1998) Capacitative Ca²⁺ entry and the regulation of smooth muscle tone. *Trends Pharmacol Sci* **19**:266-269.
- Goldbeter A, Dupont G and Berridge MJ (1990) Minimal model for signal-induced Ca²⁺ oscillations and for their frequency encoding through protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:1461-1465.
- Gómez-Pinilla PJ, Camello-Almaraz C, Moreno R, Camello PJ and Pozo MJ (2006) Melatonin treatment reverts age-related changes in Guinea pig

- gallbladder neuromuscular transmission and contractility. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:847-856.
- Gómez-Pinilla PJ, Gómez MF, Sward K, Hedlund P, Hellstrand P, Camello PJ, Andersson KE and Pozo MJ (2008) Melatonin restores impaired contractility in aged guinea pig urinary bladder. *J Pineal Res* **44**:416-425.
- Gómez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Baba A, Matsuda T and Camello PJ (2007) Ca²⁺ extrusion in aged smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* **74**:860-869.
- Gómez-Villafuertes R, Mellstrom B and Naranjo JR (2007) Searching for a role of NCX/NCKX exchangers in neurodegeneration. *Mol Neurobiol* **35**:195-202.
- Gómez-Viquez L, Guerrero-Serna G, Garcia U and Guerrero-Hernandez A (2003) SERCA pump optimizes Ca²⁺ release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells. *Biophys J* **85**:370-380.
- González De La Fuente P, Savineau JP and 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.
- González MC, Arribas SM, Molero F and Fernandez-Alfonso MS (2001) Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**:H2876-2881.
- Gutterman DD (1999) Adventitia-dependent influences on vascular function. *Am J Physiol* **277**:H1265-1272.
- Hall J, Jones TH, Channer KS and Jones RD (2006) Mechanisms of agonist-induced constriction in isolated human mesenteric arteries. *Vascul Pharmacol* **44**:427-433.
- Hayflick L (2007) Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* **1100**:1-13.

- Hirano K (2007) Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Sci* **104**:109-115.
- Hurwitz L, Joiner PD and Von Hagen S (1967) Calcium pools utilized for contraction in smooth muscle. *Am J Physiol* **213**:1299-1304.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:9265-9269.
- Iino M (2010) Spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ signaling and its physiological roles. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**:244-256.
- Iino M, Kasai H and Yamazawa T (1994) Visualization of neural control of intracellular Ca²⁺ concentration in single vascular smooth muscle cells in situ. *EMBO J* **13**:5026-5031.
- Itoh T, Kuriyama H and Suzuki H (1981) Excitation--contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *J Physiol* **321**:513-535.
- Janiak R, Wilson SM, Montague S and Hume JR (2001) Heterogeneity of calcium stores and elementary release events in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C22-33.
- Jin L, Liu T, Lagoda GA, Champion HC, Bivalacqua TJ and Burnett AL (2006) Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age-associated erectile dysfunction. *FASEB J* **20**:536-538.
- Kamm KE and Stull JT (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* **276**:4527-4530.
- Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, Matoba T, Kunihiro I, Morikawa K, Ito M, Takahashi S, Kaibuchi K and Takeshita A (2002) Involvement of rho-

- kinase in agonists-induced contractions of arteriosclerotic human arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:243-248.
- Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ and Sato K (1997) Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* **49**:157-230.
- Karlstad J, Sun Y and Singh BB (2012) Ca(2+) signaling: an outlook on the characterization of Ca(2+) channels and their importance in cellular functions. *Adv Exp Med Biol* **740**:143-157.
- Kikkawa Y, Matsuo S, Kameda K, Hirano M, Nakamizo A, Sasaki T and Hirano K (2003) Mechanisms underlying potentiation of endothelin-1-induced myofilament Ca(2+) sensitization after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**:341-352.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A and Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**:245-248.
- Kuo KH, Dai J, Seow CY, Lee CH and van Breemen C (2003) Relationship between asynchronous Ca²⁺ waves and force development in intact smooth muscle bundles of the porcine trachea. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**:L1345-1353.
- Kuszczyk I, Kuner R, Samson SE and Grover AK (2010) Proximity of Na⁺-Ca²⁺-exchanger and sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in pig coronary artery smooth muscle: fluorescence microscopy. *Mol Cell Biochem* **339**:293-300.
- Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Schafer C, Maxeiner H and Piper HM (1999) Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Am J Physiol* **276**:H1868-1876.

- Lagaud GJ, Randriamboavonjy V, Roul G, Stoclet JC and Andriantsitohaina R (1999) Mechanism of Ca²⁺ release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *Am J Physiol* **276**:H300-308.
- Lamont C and Wier WG (2004) Different roles of ryanodine receptors and inositol (1,4,5)-trisphosphate receptors in adrenergically stimulated contractions of small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**:H617-625.
- Lee CH, Kuo KH, Dai J, Leo JM, Seow CY and Breemen C (2005) Calyculin-A disrupts subplasmalemmal junction and recurring Ca²⁺ waves in vascular smooth muscle. *Cell Calcium* **37**:9-16.
- Lee CH, Poburko D, Kuo KH, Seow CY and van Breemen C (2002a) Ca²⁺ oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**:H1571-1583.
- Lee CH, Poburko D, Sahota P, Sandhu J, Ruehlmann DO and van Breemen C (2001) The mechanism of phenylephrine-mediated [Ca²⁺]_i oscillations underlying tonic contraction in the rabbit inferior vena cava. *J Physiol* **534**:641-650.
- Lee CH, Rahimian R, Szado T, Sandhu J, Poburko D, Behra T, Chan L and van Breemen C (2002b) Sequential opening of IP₃-sensitive Ca²⁺ channels and SOC during alpha-adrenergic activation of rabbit vena cava. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**:H1768-1777.
- Leung FP, Yung LM, Yao X, Laher I and Huang Y (2008) Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* **153**:846-857.
- Leung T, Manser E, Tan L and Lim L (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* **270**:29051-29054.

- Long W, Zhao Y, Zhang L and Longo LD (1999) Role of Ca(2+) channels in NE-induced increase in [Ca(2+)](i) and tension in fetal and adult cerebral arteries. *Am J Physiol* **277**:R286-294.
- Lopes GS, Ferreira AT, Oshiro ME, Vladimirova I, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A and Smaili SS (2006) Aging-related changes of intracellular Ca²⁺ stores and contractile response of intestinal smooth muscle. *Exp Gerontol* **41**:55-62.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**:233-241.
- Marin J, Encabo A, Briones A, Garcia-Cohen EC and Alonso MJ (1999) Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci* **64**:279-303.
- Marthan R (2004) Store-operated calcium entry and intracellular calcium release channels in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**:L907-908.
- Martínez AC, Hernandez M, Prieto D, Raposo R, Pagan RM, Garcia-Sacristan A and Benedito S (2006) Enhanced histamine-mediated contraction of rabbit penile dorsal artery in diet-induced hypercholesterolemia. *Vascul Pharmacol* **44**:34-41.
- Martínez MC, Randriamboavonjy V, Ohlmann P, Komasa N, Duarte J, Schneider F, Stoclet JC and Andriantsitohaina R (2000) Involvement of protein kinase C, tyrosine kinases, and Rho kinase in Ca(2+) handling of human small arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**:H1228-1238.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T and Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* **122**:498-505.
- Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A and Kaibuchi K (1996) Rho-associated kinase, a

novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* **15**:2208-2216.

Matsuo Y, Kuwabara M, Tanaka-Totoribe N, Kanai T, Nakamura E, Gamoh S, Suzuki A, Asada Y, Hisa H and Yamamoto R (2011) The defective protein level of myosin light chain phosphatase (MLCP) in the isolated saphenous vein, as a vascular conduit in coronary artery bypass grafting (CABG), harvested from patients with diabetes mellitus (DM). *Biochem Biophys Res Commun* **412**:323-327.

Mauban JR, Lamont C, Balke CW and Wier WG (2001) Adrenergic stimulation of rat resistance arteries affects Ca(2+) sparks, Ca(2+) waves, and Ca(2+) oscillations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**:H2399-2405.

McCarron JG, Bradley KN, MacMillan D, Chalmers S and Muir TC (2004) The sarcoplasmic reticulum, Ca²⁺ trapping, and wave mechanisms in smooth muscle. *News Physiol Sci* **19**:138-147.

McCarron JG, Chalmers S, Bradley KN, MacMillan D and Muir TC (2006) Ca²⁺ microdomains in smooth muscle. *Cell Calcium* **40**:461-493.

McDonnell BJ, Maki-Petaja KM, Munnery M, Yasmin, Wilkinson IB, Cockcroft JR and McEniery CM (2013) Habitual exercise and blood pressure: age dependency and underlying mechanisms. *Am J Hypertens* **26**:334-341.

McFadzean I and Gibson A (2002) The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol* **135**:1-13.

Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, Hallam TJ, Jacob R, Jaxa-Chamiec A, Leigh BK, McCarthy SA, Moores KE and Rink TJ (1990) SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J* **271**:515-522.

- Miriel VA, Mauban JR, Blaustein MP and Wier WG (1999) Local and cellular Ca^{2+} transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J Physiol* **518** (Pt 3):815-824.
- Misfeldt MW, Aalkjaer C, Simonsen U and Bek T (2010) Voltage-gated calcium channels are involved in the regulation of calcium oscillations in vascular smooth muscle cells from isolated porcine retinal arterioles. *Exp Eye Res* **91**:69-75.
- Morikage N, Kishi H, Sato M, Guo F, Shirao S, Yano T, Soma M, Hamano K, Esato K and Kobayashi S (2006) Cholesterol primes vascular smooth muscle to induce Ca^{2+} sensitization mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway: possible role for membrane raft. *Circ Res* **99**:299-306.
- Morissette G, Petitclerc E and Marceau F (2004) Loss of function of vascular smooth muscle cells by nitric oxide-dependent and -independent interactions with tumorigenic cells. *Int J Cancer* **112**:830-839.
- Mulvany MJ and Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* **41**:19-26.
- Muranyi A, Derkach D, Erdodi F, Kiss A, Ito M and Hartshorne DJ (2005) Phosphorylation of Thr695 and Thr850 on the myosin phosphatase target subunit: inhibitory effects and occurrence in A7r5 cells. *FEBS Lett* **579**:6611-6615.
- Murphy JG and Khalil RA (2000) Gender-specific reduction in contractility and $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells of female rat. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**:C834-844.

- Neylon CB, Richards SM, Larsen MA, Agrotis A and Bobik A (1995) Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **215**:814-821.
- Nixon GF, Mignery GA and Somlyo AV (1994) Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **15**:682-700.
- Okon EB, Chung AW, Rauniyar P, Padilla E, Tejerina T, McManus BM, Luo H and van Breemen C (2005) Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients. *Diabetes* **54**:2415-2423.
- Orallo F (1996) Regulation of cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Pharmacol Ther* **69**:153-171.
- Otun H, Gillespie JI, Greenwell JR and Dunlop W (1992) Calcium oscillations in single isolated human vascular smooth muscle cells. *Exp Physiol* **77**:205-208.
- Pacaud P, Loirand G, Baron A, Mironneau C and Mironneau J (1991) Ca²⁺ channel activation and membrane depolarization mediated by Cl⁻ channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br J Pharmacol* **104**:1000-1006.
- Peng H, Matchkov V, Ivarsen A, Aalkjaer C and Nilsson H (2001) Hypothesis for the initiation of vasomotion. *Circ Res* **88**:810-815.
- Peppiatt-Wildman CM, Albert AP, Saleh SN and Large WA (2007) Endothelin-1 activates a Ca²⁺-permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes. *J Physiol* **580**:755-764.
- Potocnik SJ and Hill MA (2001) Pharmacological evidence for capacitative Ca(2+) entry in cannulated and pressurized skeletal muscle arterioles. *Br J Pharmacol* **134**:247-256.

- Pottorf WJ, Duckles SP and Buchholz JN (2000) Adrenergic nerves compensate for a decline in calcium buffering during ageing. *J Auton Pharmacol* **20**:1-13.
- Putney JW, Jr., Broad LM, Braun FJ, Lievremont JP and Bird GS (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* **114**:2223-2229.
- Putney JW, Jr. and McKay RR (1999) Capacitative calcium entry channels. *Bioessays* **21**:38-46.
- Puzianowska-Kuznicka M and Kuznicki J (2009) The ER and ageing II: calcium homeostasis. *Ageing Res Rev* **8**:160-172.
- Raina H, Zacharia J, Li M and Wier WG (2009) Activation by Ca²⁺/calmodulin of an exogenous myosin light chain kinase in mouse arteries. *J Physiol* **587**:2599-2612.
- Reckelhoff JF (2001) Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* **37**:1199-1208.
- Rembold CM (1990) Modulation of the [Ca²⁺] sensitivity of myosin phosphorylation in intact swine arterial smooth muscle. *J Physiol* **429**:77-94.
- Rembold CM (1992) Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension* **20**:129-137.
- Rhodin JAG (1980) Architecture of the Vessel Wall, in *Comprehensive Physiology* pp 1-29, John Wiley & Sons, Inc.
- Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R and Coy DH (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* **438**:159-170.

- Rubio C, Moreno A, Briones A, Ivorra MD, D'Ocon P and Vila E (2002) Alterations by age of calcium handling in rat resistance arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* **40**:832-840.
- Ruehlmann DO, Lee CH, Poburko D and van Breemen C (2000) Asynchronous Ca(2+) waves in intact venous smooth muscle. *Circ Res* **86**:E72-79.
- Ruiz E and Tejerina T (1998) Relaxant effects of L-citrulline in rabbit vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* **125**:186-192.
- Saida K (1982) Intracellular Ca release in skinned smooth muscle. *J Gen Physiol* **80**:191-202.
- Sakurada S, Takuwa N, Sugimoto N, Wang Y, Seto M, Sasaki Y and Takuwa Y (2003) Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res* **93**:548-556.
- Sanchez A, Recio P, Orensanz LM, Bustamante S, Navarro-Dorado J, Climent B, Benedito S, Garcia-Sacristan A, Prieto D and Hernandez M (2010) Mechanisms involved in the effects of endothelin-1 in pig prostatic small arteries. *Eur J Pharmacol* **640**:190-196.
- Sanders KM (2001) Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* **91**:1438-1449.
- Schuster A, Lamboley M, Grange C, Oishi H, Beny JL, Stergiopoulos N and Meister JJ (2004) Calcium dynamics and vasomotion in rat mesenteric arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* **43**:539-548.
- Schwaller B (2012) The regulation of a cell's Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome. *Adv Exp Med Biol* **740**:1-25.

- Sell M, Boldt W and Markwardt F (2002) Desynchronising effect of the endothelium on intracellular Ca²⁺ concentration dynamics in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries. *Cell Calcium* **32**:105-120.
- Sharabi Y (2012) Management of the unholy trinity diabetes-obesity-hypertension (diabetesotension). *Diabetes Metab Res Rev.*
- Shi L, Zhao L, Zeng F, Li N and Liu X (2012) Effect of exercise training volume on arterial contractility and BK(Ca) channel activity in rat thoracic aorta smooth muscle cells. *Eur J Appl Physiol* **112**:3667-3678.
- Sims SM, Chrones T and Preiksaitis HG (2008) Calcium sensitization in human esophageal muscle: role for RhoA kinase in maintenance of lower esophageal sphincter tone. *J Pharmacol Exp Ther* **327**:178-186.
- Sinnatamby CS (2003) Anatomía de Last: Regional y Aplicada, pp 238-250, Editorial Paidotribo, S.L.
- Skupin A and Thurley K (2012) Calcium signaling: from single channels to pathways. *Adv Exp Med Biol* **740**:531-551.
- Sobieszek A and Bremel RD (1975) Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin. *Eur J Biochem* **55**:49-60.
- Somlyo AP (1985) Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ Res* **57**:497-507.
- Somlyo AP and Himpens B (1989) Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* **3**:2266-2276.
- Somlyo AP and Somlyo AV (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**:231-236.

- Somlyo AP and Somlyo AV (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**:1325-1358.
- Somlyo AV and Somlyo AP (1968) Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **159**:129-145.
- Sward K, Dreja K, Lindqvist A, Persson E and Hellstrand P (2002) Influence of mitochondrial inhibition on global and local [Ca²⁺]_i in rat tail artery. *Circ Res* **90**:792-799.
- Sweadner KJ and Donnet C (2001) Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* **356**:685-704.
- Szado T, Kuo KH, Bernard-Helary K, Poburko D, Lee CH, Seow C, Ruegg UT and van Breemen C (2003) Agonist-induced mitochondrial Ca²⁺ transients in smooth muscle. *FASEB J* **17**:28-37.
- Van Breemen C (1977) Calcium requirement for activation of intact aortic smooth muscle. *J Physiol* **272**:317-329.
- van Breemen C, Chen Q and Laher I (1995) Superficial buffer barrier function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Trends Pharmacol Sci* **16**:98-105.
- Villalba N, Stankevicius E, Garcia-Sacristan A, Simonsen U and 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**:H1157-1169.
- Wang M, Monticone RE and Lakatta EG (2010) Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **19**:201-207.

- Wang Y, Zheng XR, Riddick N, Bryden M, Baur W, Zhang X and Surks HK (2009) ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **104**:531-540.
- Wayman CP, McFadzean I, Gibson A and Tucker JF (1996) Two distinct membrane currents activated by cyclopiazonic acid-induced calcium store depletion in single smooth muscle cells of the mouse anococcygeus. *Br J Pharmacol* **117**:566-572.
- Wen YY, Wang SX and Chen MQ (1999) Studies on age-related changes in vascular smooth muscle and their Ca²⁺ mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**:840-841.
- Wibo M and Godfraind T (1994) Comparative localization of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in intestinal smooth muscle: an analytical subfractionation study. *Biochem J* **297 (Pt 2)**:415-423.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H and Kannel WB (2002) Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med* **162**:1867-1872.
- Wray S and Burdyga T (2010) Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev* **90**:113-178.
- Xia Y and Khalil RA (2009) Sex-related decrease in [Ca²⁺]_i signaling and Ca²⁺-dependent contraction in inferior vena cava of female rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**:R15-24.
- Xiao D, Longo LD and Zhang L (2005) Alpha1-adrenoceptor-mediated phosphorylation of MYPT-1 and CPI-17 in the uterine artery: role of ERK/PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H2828-2835.
- Xu CB, Lei Y, Chen Q, Pehrson C, Larsson L and Edvinsson L (2010) Cigarette smoke extracts promote vascular smooth muscle cell proliferation and

enhances contractile responses in the vasculature and airway. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **107**:940-948.

Xu SZ and Beech DJ (2001) TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca²⁺ channels in native vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **88**:84-87.

Yáñez M, Gil-Longo J and Campos-Toimil M (2012) Calcium binding proteins. *Adv Exp Med Biol* **740**:461-482.

Yoshioka K, Sugimoto N, Takuwa N and Takuwa Y (2007) Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **71**:912-920.

Zholos AV, Tsytsyura YD, Philyppov IB, Shuba MF and Bolton TB (2000) Voltage-dependent inhibition of the muscarinic cationic current in guinea-pig ileal cells by SK&F 96365. *Br J Pharmacol* **129**:695-702.

Zhu Z, Tepel M, Neusser M and Zidek W (1994) Role of Na⁺-Ca²⁺ exchange in agonist-induced changes in cytosolic Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **266**:C794-799.

