

K-51-262

S/1320

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Dpto. de Fisiología Médica y Biofísica



Homeostasis del calcio en miocitos del árbol arterial pulmonar

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio 173 número 46 del libro
correspondiente. **26 MAYO 2000**
Sevilla,

El Jefe del Negociado.

TESIS DOCTORAL

Tarik Smani

Sevilla, 2000

D. José López Barneo, Catedrático, y D. Juan Ureña López, Profesor Titular, ambos en el área de Fisiología y adscritos al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla.


CERTIFICAN:

Que D. Tarik Smani Ha realizado bajo su dirección en dicho departamento el trabajo titulado **“Homeostasis del calcio en miocitos del árbol arterial pulmonar”** que presenta para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.


Sevilla, 12 de Mayo de 2000

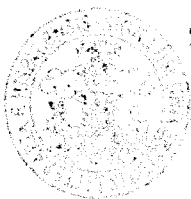
VºBº de los Directores

El interesado


Dr. José López Barneo


Dr. Juan Ureña López


D. Tarik Smani



DEPTO. DE FISIOLÓGIA MÉDICA
Y BIOFÍSICA
FACULTAD DE MEDICINA

Homeostasis del calcio
en miocitos del árbol arterial pulmonar

Tarik Smani

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'T' followed by a series of loops and a final flourish.

Tesis presentada para optar el grado de Doctor en
Biología por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2000

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
1. Homeostasis del Ca^{2+} en las células de músculo liso vascular	3
1.1. Sistemas de transporte transmembranario de Ca^{2+}	3
1.1.1. Canales de Ca^{2+}	3
1.1.2. Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$	6
1.1.3. Bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP	6
1.2. Almacenes de Ca^{2+} citosólico	7
1.2.1. Retículo sarcoplásmico	7
1.2.2. Mitocondria	9
1.3. Oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico	10
1.3.1. Eventos elementales de Ca^{2+} citosólico	11
1.3.2. Espigas de Ca^{2+} citosólico	12
2. Canales iónicos regulados por Ca^{2+}	15
2.1. Canales de cloro	17
2.2. Canales de potasio	18
2.3. Canales catiónicos no selectivos	19
3. Diferencias fisiológicas regionales y longitudinales en miocitos vasculares	19
OBJETIVOS	22

MATERIAL Y METODOS	24
1. Preparación de las células	24
1.1. Cirugía y obtención de la arteria pulmonar	24
1.2. Tratamiento enzimático y dispersión celular	25
2. Técnicas de registro	27
2.1. Medida de la $[Ca^{2+}]$ citosólico mediante técnicas microfluorimétricas	27
2.1.1. Uso del Fura-2 como indicador fluorescente	27
2.1.2. Calibración "in vitro" e "in vivo"	30
2.2. Registros electrofisiológicos	35
2.2.1. Técnica de fijación de voltaje	35
2.2.2. Técnica de fijación de corriente	38
2.2.3. Soluciones de registro	40
2.2.4. Fabricación de los electrodos de registro	42
2.2.5. Medida del potencial de unión líquida	42
3. Dispositivo experimental empleado para la medida de la $[Ca^{2+}]$ citosólico y de la actividad eléctrica	43
4. Proceder experimental y análisis de resultados	45
RESULTADOS	47
1. Oscilaciones de calcio en los miocitos arteriales pulmonares	48
1.1. Oscilaciones espontáneas o inducidas en la $[Ca^{2+}]$ citosólico	48
1.2. Los niveles basales de la $[Ca^{2+}]$ citosólico regulan la amplitud y frecuencia de las oscilaciones	50
1.3. El retículo sarcoplásmico participa de forma fundamental en la génesis de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]$ citosólico	53
1.4. Estudio e identificación farmacológica de los receptores regulados por $InsP_3$ o rianodina en los miocitos de la arteria pulmonar	55
2. Diferencias longitudinales en la generación de las oscilaciones de calcio en miocitos del árbol arterial pulmonar	60
2.1. Las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} de los miocitos de resistencia están mediadas fundamentalmente por el receptor para rianodina.	60

2.2. Las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en los miocitos de conducción están mediadas fundamentalmente por el receptor para InsP_3	62
2.3. Regulación diferencial por el AMPc de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico en los miocitos de conducción y de resistencia	64
3. El calcio citosólico como regulador de la actividad eléctrica de los miocitos arteriales	67
3.1. Relación entre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la actividad eléctrica de la membrana plasmática	68
3.1.1. Corrientes espontáneas transitorias salientes (STOCs) o entrantes (STICs) de amplitud y frecuencia irregulares	68
3.1.2. La liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico activa corrientes lentas cuya amplitud y sentido dependen del potencial de membrana	70
3.1.3. Relación temporal entre las oscilaciones de Ca^{2+} y las corrientes iónicas	74
3.2. Activación diferencial de canales de los K^+ y Cl^- por el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$	76
3.2.1. Experimentos con bloqueantes selectivos	76
3.2.2. Experimentos de fijación de voltaje y de corriente con sustitución iónica	79
3.2.2.1. Experimentos de fijación de voltaje y de corriente realizados con la solución interna 2 ($[\text{Cl}^-]_i = 43 \text{ mM}$; $E_{\text{Cl}} = -31 \text{ mV}$; $E_{\text{K}} = -$ 99 mV)	83
3.2.2.2. Experimentos de fijación de voltaje realizados con la solución interna 3 ($[\text{Cl}^-]_i = 130 \text{ mM}$; $E_{\text{Cl}} = -3.2 \text{ mV}$; $E_{\text{K}} = -99 \text{ mV}$)	88
3.2.2.3. Experimentos de fijación de voltaje y de corriente realizados con la solución interna 4 ($[\text{Cl}^-]_i = 130 \text{ mM}$; $[\text{K}]_i = 0 \text{ mM}$; $E_{\text{Cl}} = -$ 3.2 mV)	91
3.3. Posible participación de otras conductancias iónicas reguladas por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico	93
4. La regulación del potencial de membrana por el Ca^{2+} procedente de los reservorios determina la entrada del ión a través de los canales dependientes	

del potencial	95
4.1. Canales de calcio en los miocitos pulmonares	96
4.2. Participación de los canales de Cl_{Ca} en la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje	98
DISCUSION	103
1. Oscilaciones de Ca^{2+} en células de músculo liso arterial pulmonar	104
2. Participación diferencial de los receptores para rianodina e $InsP_3$ en la generación de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos del árbol arterial pulmonar	106
2.1. Efecto de la inhibición de los receptores del retículo sarcoplásmico y de la fosfolipasa C sobre las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$	106
2.2. Diferencias longitudinales en la regulación de las oscilaciones de Ca^{2+} por el AMPc	107
2.3. Retraso entre las oscilaciones de Ca^{2+} y las corrientes transmembranarias	108
3. Especialización electrofisiológica en los miocitos de la arteria pulmonar	110
4. Repercusiones fisiológicas de las propiedades celulares diferenciales de miocitos de resistencia y conducción	112
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFIA	120
ABREVIATURAS	135

INTRODUCCION

La organización histológica arterial se caracteriza por la existencia de tres capas bien definidas (Fig. 1). Desde la luz del vaso hacia su exterior, se puede distinguir la capa endotelial cuyas células están generalmente orientadas longitudinalmente, seguida a continuación de un tejido intermedio compuesto especialmente por las células de músculo liso dispuestas de manera circular, y finalmente de tejido externo que forma la capa de adventicia, constituida fundamentalmente por fibroblastos orientados de manera longitudinal (Bloom y Fawcett, 1975).

Las células de músculo liso presentan este nombre por la ausencia de las estrías que caracterizan el músculo esquelético y cardíaco y constituyen la capa intermedia de las arterias. Estas células tienen una forma alargada cuya disposición y orientación permite la modificación del diámetro del vaso. El estado de contracción o relajación de estas células regula el flujo sanguíneo. En la figura 2 se muestra un cultivo primario de células de músculo liso obtenido por dispersión de la arteria pulmonar después de su incubación en enzimas proteolíticas (ver el apartado 1.2 en "Material y métodos"). Obsérvese cómo en este cultivo aparecen tanto células alargadas como contraídas.

La regulación de la contractilidad del músculo liso depende de múltiples factores que de una forma u otra tienen como resultado final el cambio de la concentración intracelular del ión calcio ($[Ca^{2+}]_i$), que a su vez controla el proceso de contracción del vaso (Somlyo y Somlyo, 1994).

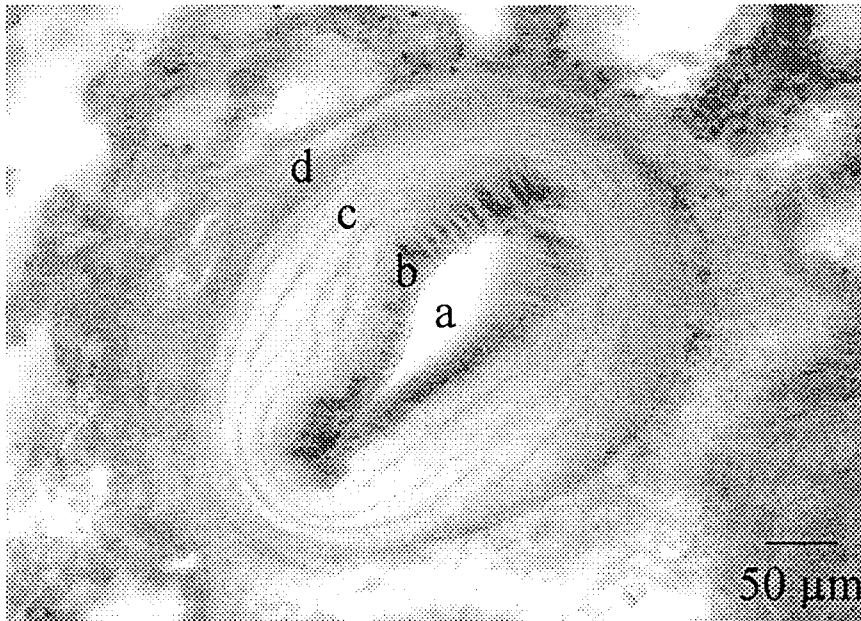


Figura 1. Fotografía de la sección de una arteriola en una rodaja de pulmón de conejo de 100 μm de grosor. a, luz del vaso; b, endotelio; c, capa de músculo liso; d, adventicia. La fotografía fue tomada en campo claro a un aumento 20 X.

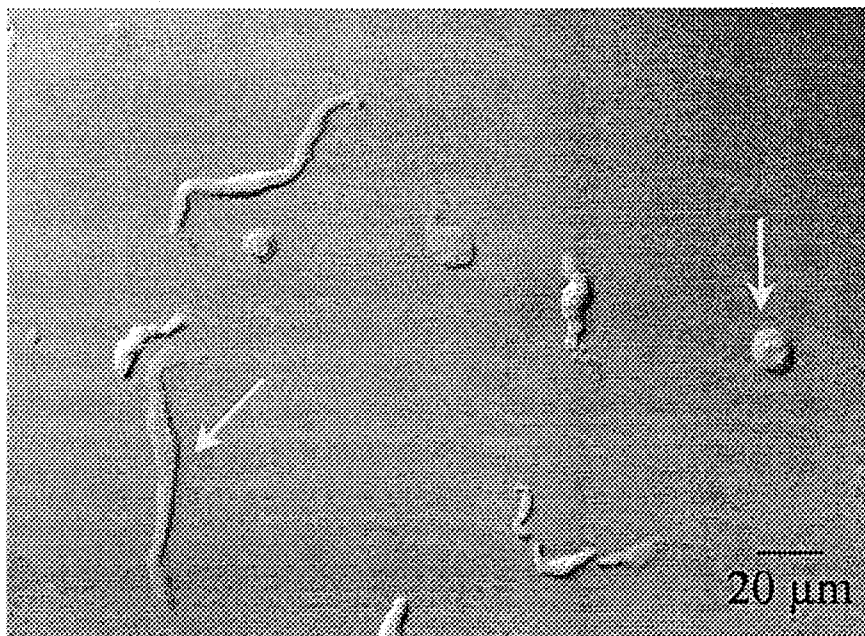


Figura 2. Fotografía representativa de un cultivo de células de músculo liso vascular de pulmón tras el tratamiento enzimático. Las flechas muestran una célula alargada y otra contraída típicas de músculo liso. La fotografía fue tomada a un aumento 40 X.

Por esta razón el estudio de la regulación de la concentración de calcio citosólico es de importancia fundamental para comprender la fisiología del músculo liso vascular.

1. Homeostasis del Ca^{2+} en las células de músculo liso vascular

Los miocitos vasculares responden a estímulos eléctricos, mecánicos y químicos con un incremento de Ca^{2+} intracelular. Esta respuesta es el resultado de la actividad coordinada de numerosos eventos que dan lugar bien al flujo de calcio desde el medio extracelular o bien a la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares. Al mismo tiempo, la acción conjunta de proteínas citoplasmáticas como la calmodulina y los reservorios intracelulares como la mitocondria y el retículo sarcoplásmico (RS) se encargan de capturar y almacenar el Ca^{2+} del citosol. Estos sistemas, conjuntamente con la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática hacen posible que pueda existir un alto gradiente de concentración del ión entre el medio extra (~ 1.6 mM) e intracelular (~ 100 nM) (Himpens y col., 1995).

1.1. Sistemas de transporte transmembranario de Ca^{2+}

Existen varias rutas utilizadas por el Ca^{2+} para atravesar la membrana plasmática: a) los canales iónicos, b) el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, y c) las bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP (Dipolo, 1996).

1.1.1. Canales de Ca^{2+}

El Ca^{2+} puede utilizar varios tipos de canales para atravesar la membrana plasmática (Fig. 3): los canales regulados por el voltaje, los canales regulados por ligandos y los canales acoplados a los almacenes intracelulares (Van Breemen y Saida, 1989; Berridge, 1997).

La ruta más usada por el Ca^{2+} para entrar al interior de las células de músculo liso vascular son los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, que constituyen una fuente de Ca^{2+} fundamental en el proceso de contracción. Se han descrito dos familias de canales de Ca^{2+} en las células de músculo liso vascular, los canales tipo L y T, los cuales se caracterizan por la diferencia en el curso temporal de la inactivación, los de tipo T se

inactivan más rápidamente que los canales tipo L; sus sensibilidades a las dihidropiridinas, los primeros son sensibles a ellas mientras que los segundos no lo son; y el umbral de activación, los canales tipo T se activan a potenciales más negativos que los tipo L (Benham y col., 1987; McDonald y col., 1994). Aunque el papel fisiológico que puedan desempeñar los canales tipo T es incierto, éstos podrían estar relacionados con la proliferación celular (Ertel y Erter, 1997), mientras que los canales tipo L participarían de una manera fundamental en la regulación del tono vascular. Cuando las células están en reposo con un potencial de membrana alrededor de -55 mV, aunque puede haber una pequeña entrada de Ca^{2+} al citosol, existen pocos canales tipo L abiertos (Gollash y col., 1992). Cualquier estímulo que provoque la despolarización induce la apertura de los canales y se produce una entrada masiva de Ca^{2+} siguiendo su gradiente electroquímico (Walker, 1995; Franco-Obregón y López-Barneo, 1996).

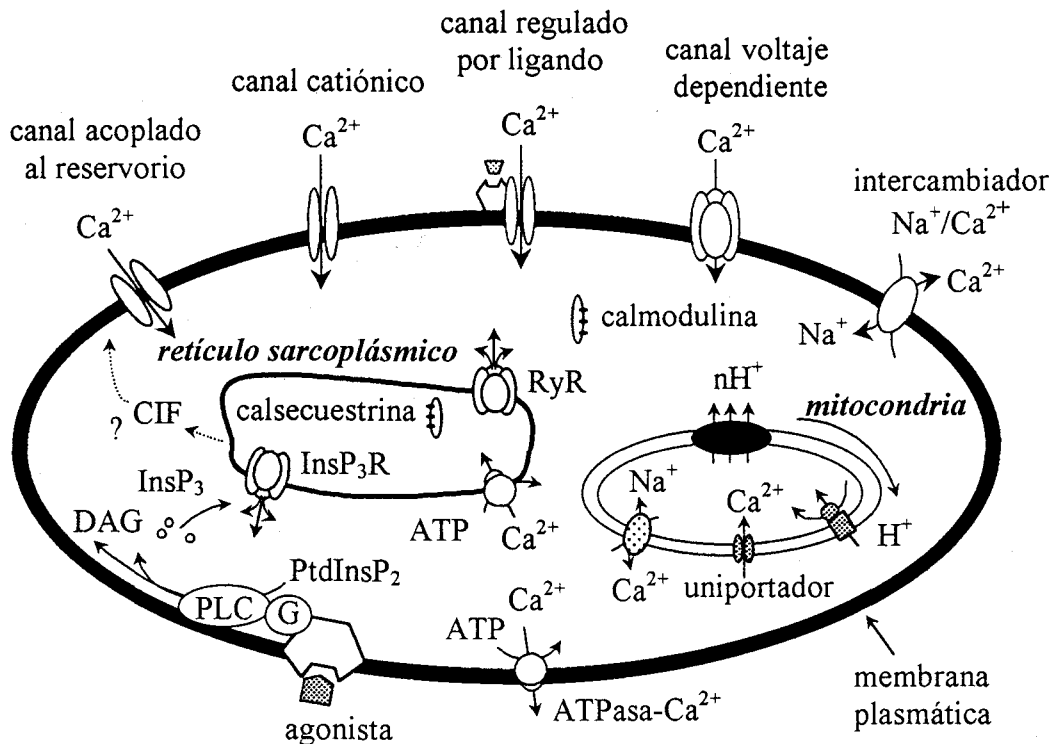


Figura 3. Esquema representativo de los diferentes mecanismos reguladores de la homeostasis de Ca^{2+} y de los mecanismos de liberación del ión del retículo sarcoplásmico (ver texto para más detalles).

La importancia de los canales tipo L en la regulación del tono vascular, se pone de manifiesto en la respuesta vasoconstrictora a la hipoxia (Weir y Archer, 1995) y en el control del tono miogénico arterial originado en respuesta a un incremento en la presión intravascular (Jaggar y col., 1998). Este tono miogénico se elimina con bloqueantes de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, cuando se quita el Ca^{2+} del medio extracelular, y con la hiperpolarización de la membrana (Nelson y col., 1990). Por otro lado, el efecto vasodilatador de algunos agentes (amilodipina, verapamil, o nifedipina) se debe a su acción de bloqueo sobre estos canales (Hughes, 1998), mientras que las sustancias vasoconstrictoras (noradrenalina, serotonina, angiotensina II, etc.) favorecen la apertura de los mismos (Mironneau y Macrez-Lepretre, 1995).

La otra vía importante que utiliza el Ca^{2+} para entrar al interior de la célula es a través de los canales regulados por ligandos. Estos canales se activan mediante la unión de un ligando al receptor, produciéndose un cambio conformacional del canal que permite el flujo de Ca^{2+} hacia el citosol (Barrantes, 1996). El canal más común es el catiónico, que cuando se activa permite la entrada de Ca^{2+} además de otros iones. Varios agonistas activan la entrada no selectiva de cationes mediante la activación de una proteína G, este es el caso de la acción la acetilcolina sobre los receptores nicotínicos en los miocitos de la arteria traqueal (Janssen y Sims, 1992) y el carbacol para los receptores muscarínicos en los miocitos gástricos (Kim y col., 1998). por su parte, el ATP puede mediar la entrada de cationes a través la activación directa de los receptores purinérgicos tipo P2x y P2z como es el caso en miocitos gástricos (Ugur y col., 1997).

Además de los canales catiónicos regulados por ligandos, en las células de músculo liso existen canales catiónicos activados por el estiramiento (“stretch-activated channels”). Estos canales permiten el flujo hacia el citosol de diferentes cationes, incluyendo el Ca^{2+} , lo que induce a la despolarización de la célula en condiciones fisiológicas, por lo que pueden participar en la modulación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y por consiguiente en la regulación del tono miogénico o la contracción (Setoguchi y col., 1997).

El flujo de Ca^{2+} hacia el citosol también se puede llevar a cabo a través de los canales regulados por el contenido de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. Esos canales se activan cuando los reservorios se encuentran vacíos produciéndose la

entrada capacitativa del ión (Putney, 1990). Este proceso parece originarse bien por la generación de un mensajero químico difusible (el CIF “Ca²⁺ influx factor”) o por la interacción directa proteína-proteína entre el retículo sarcoplásmico y la membrana plasmática (Berridge, 1995). Esta vía es independiente de la generación del inositol trifosfato y es resistente a los bloqueantes de los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes. Aunque inicialmente se suponía que la entrada capacitativa de Ca²⁺ no intervenía en los mecanismos de contracción del vaso, evidencias recientes sugieren que también los canales acoplados al reservorio pueden participar en la regulación del tono vascular (Gibson y col., 1998).

1.1.2. Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

El intercambiador Na⁺/Ca²⁺ es responsable de buena parte de la entrada y salida de calcio a través de la membrana plasmática dependiendo del modo de funcionamiento (McCarron y col., 1999). Los cambios en los gradientes de Na⁺ y Ca²⁺ a través de la membrana pueden originar profundas modificaciones en los movimientos de Ca²⁺ a través del intercambiador. Básicamente, este sistema permite la salida de Ca²⁺ dependiendo de la concentración de Na⁺ extracelular (modo directo de funcionamiento) o la entrada de Ca²⁺ al citosol, dependiendo de la concentración intracelular de Na⁺ (modo inverso) (véase Fig. 3). El transportador es electrogénico, en músculo cardíaco intercambia 3 Na⁺ por 1 Ca²⁺, movilizand una carga neta y puede ser regulado por substratos intracelulares (ATP, Ca²⁺ y fosfolípidos). Su afinidad para el Ca²⁺ se incrementa por la calmodulina, el AMPc y se bloquea por el Ni²⁺ (Kappl y Hartung, 1996). Este intercambiador parece participar en numerosos fenómenos fisiopatológicos, como es el caso del incremento de tono vascular (Leblanc y Leung, 1995) y la hipertensión arterial (Blaustein, 1993).

1.1.3. Bomba de Ca²⁺ dependiente de ATP

Las células de músculo liso usan la bomba de Ca²⁺ dependiente de ATP como mecanismo de transporte de Ca²⁺ en contra del gradiente electroquímico. Estas bombas se encuentran en la membrana plasmática y en la de los orgánulos intracelulares como el retículo sarcoplásmico y la mitocondria. La energía liberada por

la hidrólisis de una molécula ATP se transfiere a la enzima ATPasa que se activa, une el Ca^{2+} y lo bombea contra su gradiente (Himpens y col., 1995).

A pesar de que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es responsable de buena parte de la entrada y salida de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, la bomba de Ca^{2+} dependiente de ATP es la que provoca el tránsito hacia el exterior de Ca^{2+} cuando las células se encuentran en estado de reposo (Himpens, y col., 1995).

1.2. Almacenes de Ca^{2+} citosólico

Con objeto de procesar señales fisiológicas y ejercer un efecto amortiguador sobre los niveles de Ca^{2+} intracelular, en el citosol se localizan proteínas capaces de unir Ca^{2+} y discriminar otros iones como Mg^{2+} y cationes monovalentes. Algunas de estas proteínas además de unir Ca^{2+} son reguladas por el ión (calmodulina, troponina C, Proteínas S100, clapaínas, α -actininas y enzimas dependientes de Ca^{2+}), mientras que otras ligan Ca^{2+} pero no modulan una función (paralbúmina y calbindinas) (Dipolo, 1996). La calmodulina tal vez sea la proteína más importante por su alta concentración en cerebro ($\sim 30 \mu\text{M}$) y músculo liso ($\sim 28 \mu\text{M}$). Esta proteína dispone de cuatro sitios de unión de alta afinidad para el Ca^{2+} , lo cual puede suponer que una alta fracción de Ca^{2+} citosólico en reposo esté unida a la misma.

Además de estas proteínas, existen almacenes intracelulares que acumulan gran concentración de Ca^{2+} y que en determinadas situaciones se comportan como fuentes del ión y lo liberan al citosol. Estos reservorios intracelulares son el retículo sarcoplásmico y la mitocondria (Clapham, 1995).

1.2.1. Retículo sarcoplásmico

En las células de músculo liso el retículo sarcoplásmico constituye el sistema especialmente diseñado para el almacenamiento del calcio intracelular el cual puede ser liberado rápidamente hacia el citoplasma como consecuencia de un estímulo fisiológico. Estos reservorios tienen tres componentes principales (Fig. 3): a) bombas para secuestrar Ca^{2+} (ATPasa- Ca^{2+}), que constituyen el 90-95% del total de las proteínas del retículo. La ATPasa interacciona con el Ca^{2+} con alta afinidad acumulando 2 iones de Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada. Esta bomba se

bloquea irreversiblemente por tapsigargina y reversiblemente por ácido ciclopiazónico; b) proteínas que unen Ca^{2+} dentro del retículo (calsequestrina y calreticulina); y c) receptores específicos para liberar calcio hacia el citosol. Se han descritos dos tipos de receptores en músculo liso: el sensible a rianodina y a cafeína (RyR), (Gregoire y col., 1993; Ganitkevich y Isenberg, 1995; Kamishima y McCarron, 1997) y aquellos que usan inositol 1,4,5 trifosfato (InsP_3R) para la liberación de Ca^{2+} del reservorio (Ehrlich y Watras, 1988; Berridge y Irvine, 1989; Iino, 1990). Estos receptores se comportan como canales iónicos cuando se estimulan favoreciéndose el flujo de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico al citosol. Existen evidencias de que los RyR y InsP_3R pueden estar localizados en regiones específicas dentro de las células y variar de célula a célula. Por ejemplo el RyR está presente en músculo esquelético, pero en ovocitos de *Xenopus* sólo se han encontrado InsP_3R . En las células del músculo liso vascular, existen ambos receptores, aunque éstos se pueden localizar en un mismo reservorio o en reservorios separados (Tribe y col., 1994; Boittin y col., 1999).

El RyR recibe este nombre por su gran capacidad de unir el alcaloide rianodina que lo bloquea a concentraciones superiores a $10\ \mu\text{M}$, mientras que a concentraciones inferiores lo activa. Como bloqueantes de este receptor también se utiliza el rojo de rutenio y el Mg^{2+} , que inhibe la liberación de Ca^{2+} compitiendo con el sitio de unión de Ca^{2+} (Ehrlich y col., 1994). En los últimos años varios autores han propuesto el cADP ribosa como un agonista fisiológico de estos receptores (Galione, 1993; Lee, 1993).

Aunque a concentraciones milimolares de Ca^{2+} se pueden inhibir los receptores de rianodina, éstos muestran una gran sensibilidad a la $[\text{Ca}^{2+}]$, una pequeña entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes localizados en la membrana plasmática puede originar una liberación masiva de calcio desde el retículo sarcoplásmico dando lugar al proceso denominado liberación de calcio inducida por calcio (CICR; Berridge, 1997). Un agente usado con frecuencia para estimular el RyR es la cafeína, que incrementa su sensibilidad al Ca^{2+} y actúa comportándose como un ligando que cuando se une al receptor aumenta el número y el tiempo de apertura de los canales que liberan Ca^{2+} al citosol (Rousseau y col., 1988; Guerrero y col., 1994).

El otro receptor presente en el retículo sarcoplásmico es el regulado por InsP_3 , generado como consecuencia de la activación, mediante hormonas o agonistas, de receptores específicos presentes en la membrana plasmática acoplados a una proteína G (Fig. 3). La interacción entre esta proteína con la fosfolipasa C (PLC) hidroliza el precursor lipídico ligado a la membrana, el fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PtdInsP_2) en inositol 1,4,5 trifosfato (InsP_3) más diacilglicerol (DAG). Estos dos segundos mensajeros definen dos vías separadas, el DAG permanece fijado a la membrana plasmática y estimula la proteínaquinasa C responsable de la fosforilación de proteínas, mientras que el InsP_3 difunde libremente en el interior celular y activa su correspondiente receptor del retículo sarcoplásmico provocando la liberación de Ca^{2+} al citosol. La respuesta de Ca^{2+} a la unión de InsP_3 a su receptor es bifásica. En ausencia de Ca^{2+} , el InsP_3 tiene poco efecto como agente liberador de Ca^{2+} , mientras que su máximo efecto se obtiene aproximadamente a una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 300 nM (retroalimentación positiva); por encima de esta concentración, existe una retroalimentación negativa o inhibición de la liberación de Ca^{2+} . Estos dos mecanismos pueden actuar secuencialmente, la retroalimentación positiva aumentaría la liberación de Ca^{2+} inicialmente entrando en juego a continuación la retroalimentación negativa inhibiendo la liberación de Ca^{2+} (Iino, 1990). La unión de InsP_3 a su receptor puede ser inhibida por la heparina (Kobayashi y col., 1988).

1.2.2. Mitocondria

La mitocondria juega un papel importante en la síntesis de ATP y en la regulación del Ca^{2+} intracelular en músculo liso (Smith, 1996). La membrana interna mitocondrial está caracterizada por la presencia de una cadena respiratoria formada esencialmente por tres complejos enzimáticos que transportan los electrones desde el NADH hasta el O_2 , al mismo tiempo que bombean los protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio entre las membranas internas y externas de la mitocondria. El transporte de estos últimos crea un gradiente electroquímico de H^+ a lo largo de la membrana interna de la mitocondria, y el flujo de estos protones hacia la matriz, a favor de gradiente, se emplea en la síntesis de ATP a través de la activación de una ATP sintasa (Alberts y col., 1994).

Además de la cadena respiratoria la membrana interna de la mitocondria posee sistemas de transporte de calcio que hacen posible el movimiento de este ión a través de ella estableciendo un ciclo entre el Ca^{2+} citoplasmático y el mitocondrial. El ciclo comprende: a) un uniportador de Ca^{2+} que permite la entrada del ión siguiendo el gradiente electroquímico (el interior de la mitocondria es eléctricamente negativo debido al transporte activo de protones al citosol). La entrada de Ca^{2+} , en condiciones fisiológicas, puede ser inhibida por Mg^{2+} y artificialmente por rojo de rutenio; b) un sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ capaz de promover la salida electroneutra de los iones Ca^{2+} (2 Na^+ por 1 Ca^{2+}), que constituye el mecanismo más importante de la salida de Ca^{2+} (véase Fig. 3) (Gunter y Gunter, 1994). Bajo condiciones fisiológicas estos mecanismos regulan la concentración de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial y permiten que cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol se reflejen en cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la matriz mitocondrial, lo cual es importante ya que el Ca^{2+} regula una serie de enzimas en la matriz mitocondrial que afectan a la velocidad de producción de ATP. Esta acumulación de Ca^{2+} por la mitocondria se previene con el uso del CCCP, un protonóforo que disipa el gradiente electroquímico de protones y provoca una inhibición de la producción de ATP. Sin embargo, la inhibición de la fosforilación oxidativa mediante la oligomicina, inhibe específicamente la síntesis de ATP sin afectar al gradiente de protones (McCarron y Muir, 1999).

Experimentos realizados en la arteria pulmonar con el indicador fluorescente rhod-2 mitocondrial, muestran que un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producido por la aplicación de cafeína es seguido por un aumento sostenido en la concentración de Ca^{2+} mitocondrial (Drummond y Tuft, 1999). Otros resultados indican la participación de la mitocondria en la regulación de la liberación de Ca^{2+} inducida por InsP_3 originada en ovocitos de *Xenopus* (Jouaville y col., 1995). Al mismo tiempo se han descrito mediante técnicas de imagen, que en células HeLa, existen interconexiones entre la mitocondria y el retículo endoplásmico (Rizzuto y col., 1998), lo cual refleja el papel fisiológico que puede jugar la mitocondria en la regulación del Ca^{2+} intracelular.

1.3. Oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico

Los receptores del retículo sarcoplásmico se comportan como canales intracelulares que liberan Ca^{2+} , los cuales pueden activarse autónomamente o cuando

están estimulados fisiológicamente. El reclutamiento de un grupo de eventos elementales, generados sincrónicamente, puede dar lugar a una señal global de Ca^{2+} que iniciándose en una determinada región del citosol puede propagarse a lo largo de la célula de manera regenerativa en forma de ondas de Ca^{2+} (Bootman y Berridge, 1995).

1.3.1. Eventos elementales de Ca^{2+} citosólico

Durante estos últimos años y con el desarrollo de las técnicas de imagen, se han registrado en diferentes preparaciones señales de Ca^{2+} elementales que representan la liberación de Ca^{2+} como consecuencia de la activación de uno o un pequeño grupo de receptores intracelulares de Ca^{2+} . Cuando este fenómeno está mediado por los receptores sensibles a rianodina, los eventos elementales se denominan “sparks”, los cuales han sido registrados, entre otras, en las células de músculo liso vascular (Mironneau y col., 1996) y cardíaco (Cheng y col., 1993). Algunos investigadores establecen que los “sparks” están compuestos de elementos más fundamentales denominados “quarks” (ver por ejemplo Lipp y Niggli, 1996). Cuando los receptores involucrados en la génesis de estos eventos son los sensibles a InsP_3 , se les denomina “puffs”, los cuales han sido registrados en los ovocitos de *Xenopus*. En este caso, los elementos fundamentales se denominan “blips” (Yao y col., 1995), considerando que éstos pueden representar la actividad de un sólo receptor de liberación de Ca^{2+} .

En los miocitos vasculares, la apertura de un pequeño grupo de receptores sensibles a InsP_3 o a rianodina produce incrementos elementales y discretos de Ca^{2+} que son capaces de activar conductancias iónicas presentes en la membrana plasmática produciendo corrientes iónicas salientes (STOCs) o entrantes (STICs), dependiendo de la naturaleza de los canales que se activan por el Ca^{2+} . Esta actividad eléctrica originada como consecuencia de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico será descrita posteriormente (ver el apartado 3.1.1 en “Resultados”). La coordinación de los eventos elementales discretos puede causar unas elevaciones de Ca^{2+} que incrementan la excitabilidad de los receptores intracelulares y contribuyen así a la generación de una señal global de Ca^{2+} (Berridge, 1997).

1.3.2. Espigas de Ca^{2+} citosólico

Se han registrado oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} citosólico en diferentes preparaciones de músculo liso (Kawanishi y col., 1994; Salter y col., 1995; Ureña y col., 1996; Wu y col., 1996; ZhuGe y col., 1998). Estas oscilaciones también se han registrado en músculo liso de la arteria pulmonar en respuesta a diferentes agentes como el ATP, angiotensina II, serotonina, o la endotelina-1, (Hyvelin y col., 1988; Guibert y col., 1996a; Guibert y col., 1996b; Yuan y col., 1997b) y en la línea celular de músculo liso A7r5 (Blatter y Wier, 1992). En miocitos aislados de la arteria pulmonar también se han registrado oscilaciones de las corrientes registradas con la técnica de “patch-clamp” (Hogg y col., 1993b; Hartley y Kozłowski, 1997).

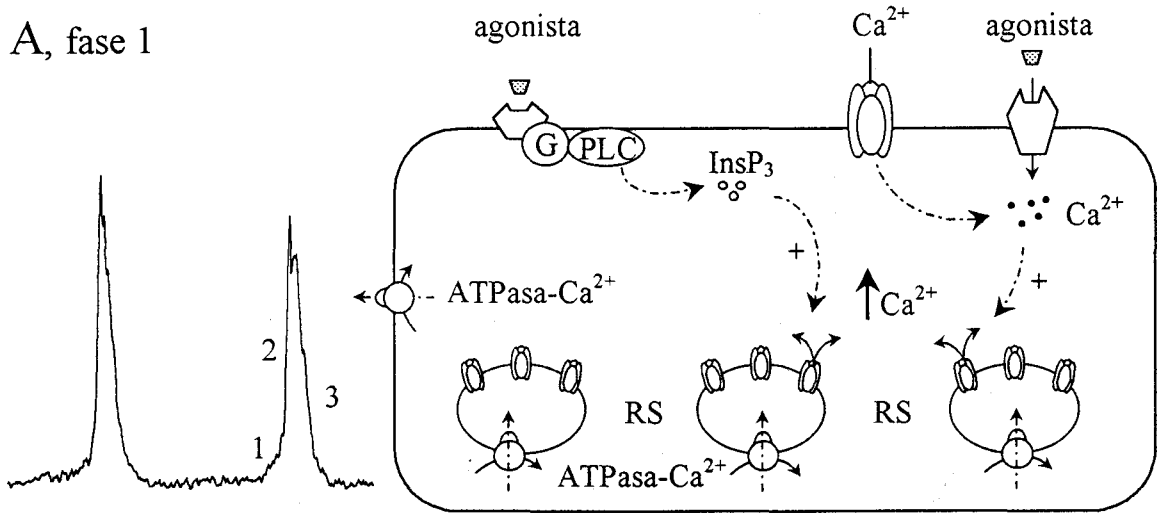
Las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico o espigas de Ca^{2+} son señales globales que se generan como resultado de la liberación sincronizada de Ca^{2+} en un gran número de receptores intracelulares. La regulación de la apertura y cierre de estos receptores mediante el Ca^{2+} produce un proceso regenerativo que convierte al citosol en un medio excitable (Berridge, 1997). Estas espigas de Ca^{2+} citosólico se han registrado en miocitos de la vena porta con técnicas de imagen, las cuales han permitido determinar el lugar de inicio de las espigas y comprobar que coincide con la localización de los “sparks” de Ca^{2+} , lo que muestra que la generación y propagación de una onda de Ca^{2+} en el citosol se debe a la activación secuencial de los “sparks” (Mironneau y col., 1996).

En las células de músculo liso existen dos mecanismos que regulan la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. En algunas células, como en los miocitos de la vena porta, la apertura de los receptores de los reservorios intracelulares esta acoplada a un potencial de acción de la membrana plasmática, donde la entrada de Ca^{2+} a través de los canales voltaje dependientes es posteriormente amplificada por el mecanismo de CICR desde los almacenes intracelulares (Grégoire y col., 1993). Un proceso similar ocurre en los miocitos cardíacos, donde la entrada de Ca^{2+} a través de los canales voltaje dependientes tipo L está estrechamente acoplado al retículo sarcoplásmico (López-López y col., 1995). Otras preparaciones de músculo liso, por ejemplo los miocitos de la arteria mesentérica, utilizan un proceso dependiente de agonistas (Hashimoto y col., 1986). En este caso, la noradrenalina activa, mediante una proteína G, la fosfolipasa C (PLC) y favorece la formación de InsP_3 , que

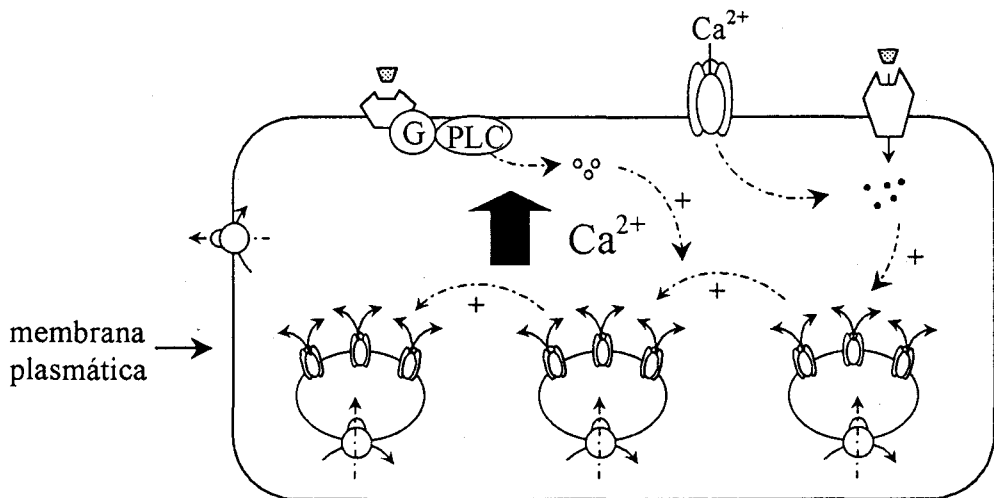
interacciona con su receptor y libera Ca^{2+} del reservorio. Este Ca^{2+} activa los receptores vecinos mediante el mecanismo del CICR (Somlyo y Somlyo, 1994).

En ambos casos, los receptores intracelulares regulan su propia actividad gracias al mecanismo de CICR usando el Ca^{2+} como segundo mensajero y originando señales complejas de Ca^{2+} citosólico (Bootman y Berridge, 1995). Un modelo explicativo de la generación de una espiga de Ca^{2+} se muestra en la figura 4, donde se incluyen los dos mecanismos descritos anteriormente. En el panel A parte izquierda, se representa el registro de dos espigas de Ca^{2+} que muestran tres fases bien diferenciadas. La primera fase corresponde a un incremento gradual y lento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ tras el cual se produce una segunda fase mucho más rápida en la que el Ca^{2+} alcanza su valor máximo. Una vez alcanzado el pico, la tercera fase corresponde con la recuperación de la concentración de Ca^{2+} hasta su valor inicial. La fase 1 (Fig. 4A) se debe a la entrada de Ca^{2+} a través los canales iónicos que activan un pequeño grupo de receptores intracelulares liberando una pequeña cantidad de Ca^{2+} que pueda representar un “spark”. En el mismo esquema se representa otra posible vía para la liberación de Ca^{2+} a través de la producción de InsP_3 debida a la estimulación de la PLC y la activación de los receptores de InsP_3 . La fase 2 de la espiga (Fig. 4B) determina el momento de la amplificación del incremento de Ca^{2+} citosólico debido a la estimulación por el Ca^{2+} liberado en la fase 1 mediante el mecanismo de CICR, o bien gracias a una estimulación repetitiva por el InsP_3 . Estos estímulos provocan una liberación masiva de Ca^{2+} que se convierte en una señal global y dan lugar al máximo valor alcanzado por la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el citosol. A partir de este momento, el ión ejerce una retroalimentación negativa sobre los receptores intracelulares e inhibe así su liberación. La puesta en marcha de las ATPasas de la membrana plasmática o del retículo sarcoplásmico hacen que el nivel de Ca^{2+} recupere su valor de partida antes de iniciarse la nueva espiga (Fig. 4C). Oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]$ se han registrado en ausencia de Ca^{2+} y aunque la célula no este permanentemente expuesta al agonista.

A, fase 1



B, fase 2



C, fase 3

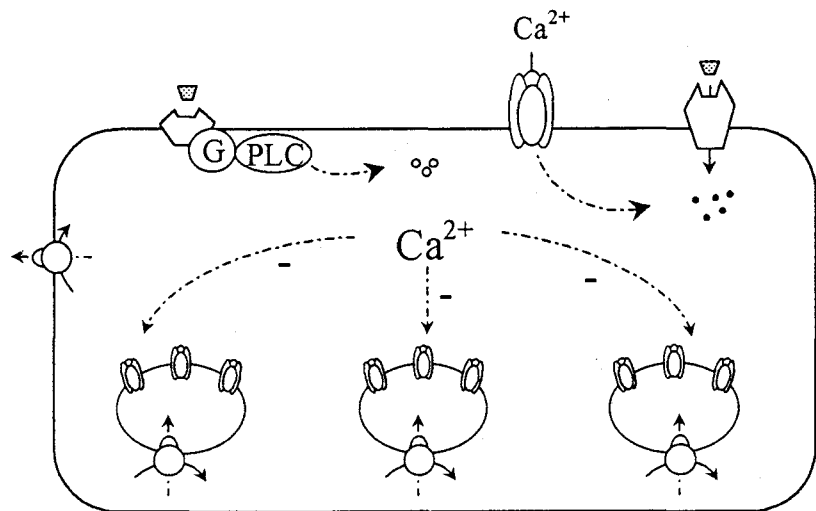


Figura 4. Modelo explicativo de la generación de las diferentes fases de una espiga de Ca^{2+} . A. Pequeña liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (fase 1). B. Liberación masiva de Ca^{2+} gracias al mecanismo de CICR (fase 2). C. Puesta en marcha de proceso activo que disminuye la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico (fase 3). (RS representa el retículo sarcoplásmico).

Las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico se han registrado también en el órgano completo, tal como en los miocitos localizados en la pared de pequeñas arterias de la cola de la rata. Estas oscilaciones de Ca^{2+} se han registrado como consecuencia de la estimulación eléctrica de las fibras del nervio simpático que inerva el órgano o en miocitos sin estimulación exógena (Iino y col., 1994; Asada y col., 1999). Estas observaciones indican que las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico pueden jugar un papel importante en el control simpático del tono vascular constituyendo un mecanismo fisiológico importante para el control del flujo y la presión sanguínea.

Además de su importancia para la contracción de las células de músculo liso, las oscilaciones de Ca^{2+} participan de forma importante en procesos fisiológicos diversos tales como la fertilización y el desarrollo de los ovocitos (Dawson, y col., 1999), la modulación neuronal y la plasticidad sináptica (Foehring y Lorenzon, 1999) y la expresión génica (Dolmetsch y col., 1998; Li y col., 1998).

2. Canales iónicos regulados por Ca^{2+}

La diferencia de concentraciones iónicas a ambos lados de la membrana plasmática y sus permeabilidades determinan el potencial de reposo celular. La expresión que relaciona estos parámetros viene dada a partir de la ecuación de Goldman, donde el potencial de membrana depende fundamentalmente de los potenciales de equilibrio de los iones más permeables.

	Concentración extracelular (mM)	Concentración intracelular (mM)	Potencial de equilibrio (mV)
K^+	6	164	-85
Cl^-	134	58	-21
Ca^{2+}	1.7	100 (nM)	250
Na^+	137	13	61

Tabla 1. Concentraciones iónicas y potenciales de equilibrio en músculo liso vascular (modificado de Hughes, 1998).

Una característica importante de las células de músculo liso, a diferencia de otras preparaciones, se refleja en la alta concentración de Cl^- intracelular (véase tabla 1) que se debe a la actividad de transportadores de Cl^- : el intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y el cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$. La alta $[\text{Cl}^-]$ intracelular determina que el potencial de equilibrio para el Cl^- este entre -20 y -30 mV (Aickin, 1990). Este hecho además de la alta permeabilidad al Cl^- hacen que el potencial de reposo de las células varíe entre -35 y -55 mV alejado del potencial de reversión de los canales de K^+ (Yuan, 1997a; Nelson y col., 1997; Bae y col., 1999). En la arteria pulmonar, la relación de permeabilidades $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ es de 0.22 (Casteels y col., 1977) y la relación de permeabilidades $P_{\text{K}}/P_{\text{Cl}}$ es de 1:0.63-0.9 (Johansson y col., 1980).

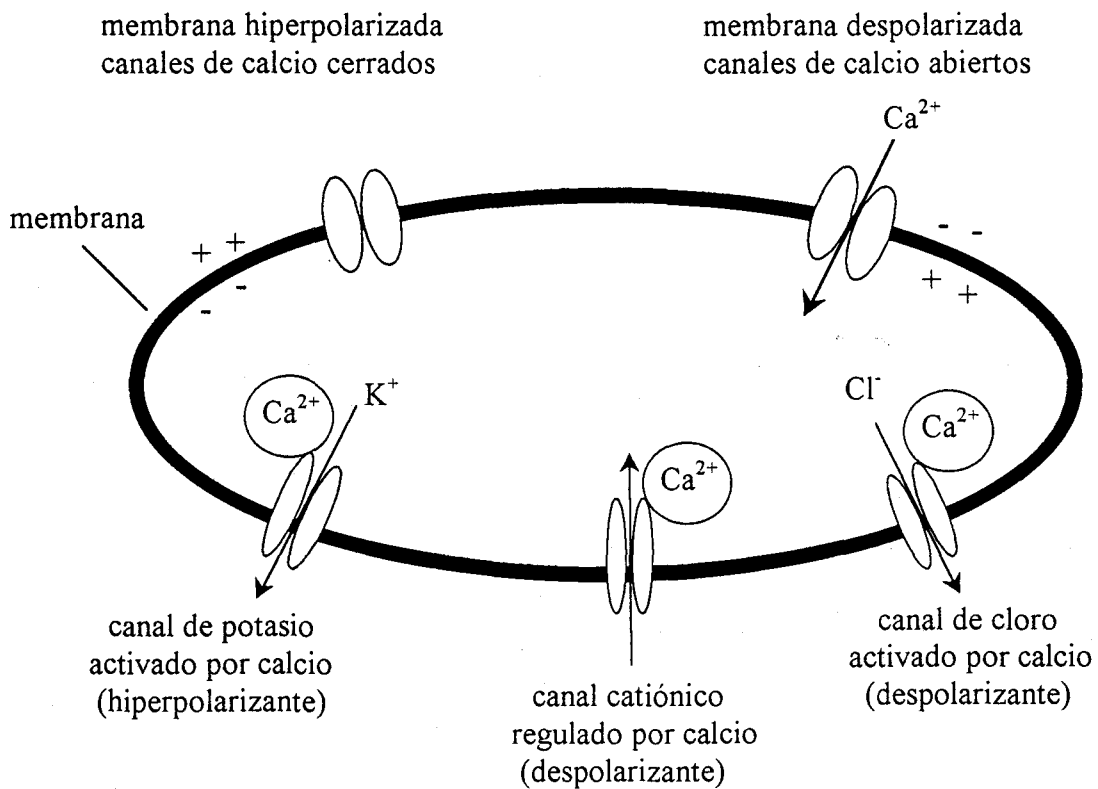


Figura 5. Esquema representativo de los diferentes canales iónicos regulados por Ca^{2+} y su participación en la modulación del potencial de membrana.

La gran diferencia que existe entre los potenciales de equilibrio para el K^+ y para el Cl^- da lugar a que cuando se activan los canales de K^+ y de Cl^- se produzcan consecuencias electrofisiológicas variables (Somlyo y Somlyo, 1994). En el músculo liso existe una amplia representación de canales de K^+ , Cl^- y cationes regulados por

Ca^{2+} , por lo que cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (espontáneos o en respuesta a estímulos fisiológicos) pueden activar estos canales iónicos, lo que les confiere una participación importante en la fisiología vascular (véase Fig. 5). La activación de los canales de potasio por Ca^{2+} resultaría en una hiperpolarización, mientras que la activación de los canales de cloro por Ca^{2+} induciría una despolarización del potencial de membrana, lo que provocaría una regulación diferente de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y por lo tanto del tono vascular.

2.1. Canales de cloro

Al contrario de lo que ocurre con otros tipos de células, la permeabilidad del ión Cl^- en las células de músculo liso vascular podría participar de una forma fundamental en el control del potencial de membrana (Amedee y col., 1990). En los miocitos vasculares se han descrito varios tipos de canales de Cl^- : los voltaje dependientes (Pusch y col., 1999), los activados por agonistas (Sun y col., 1992), los activados por cambios de volumen (Yamazaki y col., 1998), y finalmente los activados por el Ca^{2+} (Wang y Large, 1993; Clapp y col., 1996; Yuan, 1997a), que parecen ser los más abundantes en las células de músculo liso. Como bloqueantes de los canales de Cl^- se usa el DIDS, el antracén-9-carboxílico o el ácido niflúmico.

Aunque parece ser que estos canales no juegan un papel importante en la regulación del potencial de reposo en miocitos de arteria pulmonar (Bae y col., 1999), en los miocitos de arteria cerebral, la presión intravascular activa estos canales que despolarizan la arteria y contribuyen por lo tanto a la contracción (Nelson y col., 1997). La participación de estas conductancias se pone también de manifiesto en la contracción en músculo liso asociada a determinados agonistas como la fenilefrina y noradrenalina. La contracción provocada por la aplicación de la fenilefrina en anillos de arterias pulmonares de la 2ª a 4ª ramas, tiene una fase inicial transitoria y rápida (fásica) que corresponde con la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, seguida de una fase más lenta (tónica) debida a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes de la membrana plasmática, lo que mantendría el estado de contracción del vaso. La aplicación de los bloqueantes de los canales de Cl_{Ca} inhibe el segundo componente de la contracción, lo cual determina el papel que juegan estos canales en la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Yuan, 1997a). En la

arteria pulmonar, los eventos elementales de Ca^{2+} , los “sparks”, generados espontáneamente, también activan corrientes entrantes denominadas “STICs” originadas por la apertura de los canales de Cl_{Ca} (Hogg y col., 1993b).

2.2. Canales de potasio

Los cambios de permeabilidad de la membrana plasmática al K^+ constituyen también un mecanismo fundamental en el control del potencial de membrana y del tono del músculo liso vascular. Existen cuatro tipos de canales de K^+ en las células de músculo liso: los voltajes dependientes (K_{V}) que se bloquean por el tetraetilamonio (TEA), los canales activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) que se inhiben por la caribdotoxina (CTX) y TEA, los rectificadores de entrada (K_{IR}) que se bloquean por 4-aminopiridina (4AP) y los canales sensibles a ATP (K_{ATP}) que se inhiben por la glibenclamida (Hughes, 1998; Farrugia, 1999).

La apertura de los canales de potasio induce la hiperpolarización de la membrana y por lo tanto inhibe la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes favoreciendo la relajación del vaso (Brayden y Nelson, 1992; Lee y Earm, 1994). Recientemente, se ha descrito en miocitos de arteria pulmonar que los “sparks” de Ca^{2+} activan los canales de K_{Ca} que mantienen la célula hiperpolarizada, con el consiguiente control del estado de relajación del vaso (Bae y col., 1999). En miocitos cerebrales, los “sparks” producen corrientes salientes espontáneas (STOCs), debido a la apertura de canales de K_{Ca} , regulando el potencial de membrana. El bloqueo de los canales de K_{Ca} por CTX o TEA provoca la despolarización y la contracción en los anillos de arteria cerebral (Brayden y Nelson, 1992; Nelson y col., 1995). Un efecto similar se obtiene cuando se bloquea la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico mediante una alta concentración de rianodina. Por otro lado, varios vasodilatadores (agonistas β -adrenérgicos, óxido nítrico, etc) y fármacos utilizados como agentes vasoactivos, también ejercen su acción aumentando la probabilidad de apertura de los canales de potasio manteniendo la célula hiperpolarizada (Thirstrup y col., 1997).

2.3. Canales catiónicos no selectivos

Además de los canales catiónicos inespecíficos acoplados a una proteína G, descritos anteriormente en el apartado 1.1.1, existen en la membrana plasmática otros canales catiónicos no selectivos pero regulados por Ca^{2+} . Por ejemplo, en los miocitos de vena porta la subida de Ca^{2+} intracelular en respuesta a acetilcolina y noradrenalina activa canales catiónicos que conducen mayoritariamente Ca^{2+} frente a otros iones como el Na^+ (Loirand y col., 1991). Se ha descrito la presencia de canales catiónicos inespecíficos no selectivos, los cuales originan corrientes despolarizantes que conjuntamente con las hiperpolarizaciones producidas por los canales de K_{Ca} , regulan el potencial de reposo de los miocitos de la arteria pulmonar (Bae y col., 1999).

3. Diferencias fisiológicas regionales y longitudinales en miocitos vasculares

Las características funcionales de los miocitos arteriales dispersos varían no sólo entre diferentes territorios vasculares, sino dentro de un mismo territorio, entre miocitos de conducción (procedentes de arterias gruesas) o de resistencia (procedentes de arterias finas). Con técnicas electrofisiológicas se han descrito diferentes respuestas a endotelina-1 (ET-1) entre los miocitos aislados de las ramas distales de arteria pulmonar y en aorta. En los primeros la ET-1 activa oscilaciones despolarizantes del potencial de membrana asociadas al flujo de Cl^- , mientras que en aorta además de estos canales parecen participar corrientes catiónicas no selectivas (Salter y col., 1995; Bakharamov y col., 1996).

Con métodos inmunológicos y morfológicos se han encontrado al menos tres poblaciones de células en la arteria pulmonar, las cuales son fenotípicamente distintas en adulto y durante el desarrollo (Frid y col., 1994). Así mismo los segmentos arteriales extrapulmonares son más sensibles a agonistas β -adrenergicos mientras que los segmentos intrapulmonares parecen ser más sensibles a los agonistas α -adrenergicos (Kolbeck y Speir, 1987). En estas arterias se ha encontrado una distribución asimétrica de la densidad de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y de los canales K_{Ca} . Los primeros están más localizados en los miocitos de resistencia (Franco-Obregón y López-Barneo, 1996), mientras que los segundos predominan fundamentalmente en los miocitos de conducción (Albarwani y col., 1995; Archer y

Recientemente se han descrito en arteria mesentérica canales de Ca^{2+} voltaje dependientes insensibles a nifedipina que predominan fundamentalmente en las ramas de la arteria (Morita y col., 1999).

Diferente regulación del flujo sanguíneo arterial también se produce cuando disminuye la presión parcial de oxígeno (PO_2). En las arterias sistémicas, de conducción y las ramas primarias de la arteria pulmonar el efecto de hipoxia se caracteriza por una vasodilatación que favorece el flujo sanguíneo. Sin embargo, en las ramas más finas de la arteria pulmonar, la disminución de la PO_2 induce una vasoconstricción, desviando el flujo sanguíneo a territorios mejor ventilados (véase Fig. 6).

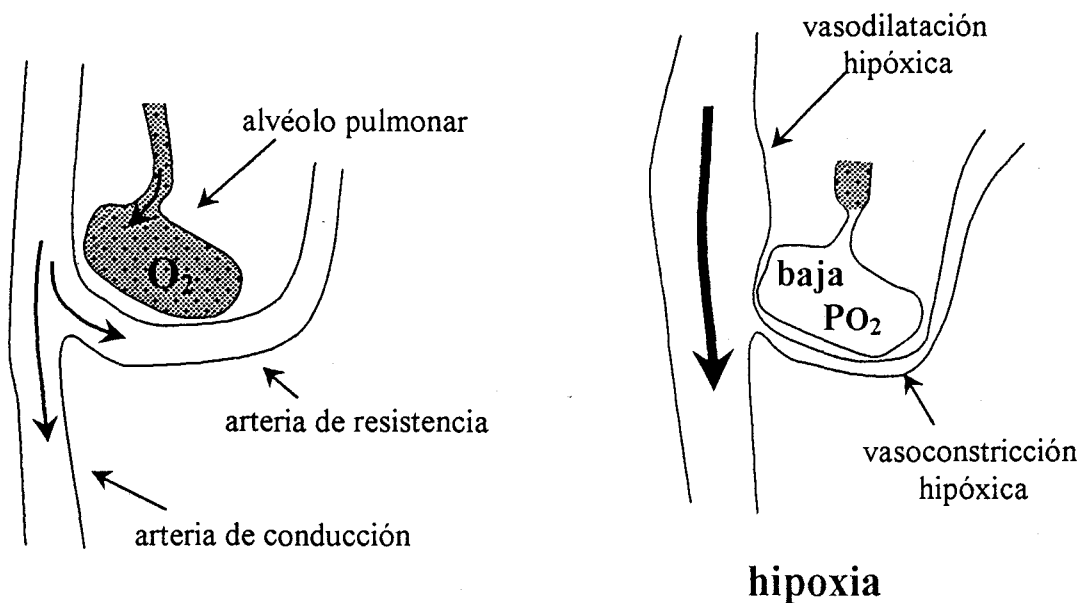


Figura 6. Esquema representativo de la repuesta vasomotora de la arteria pulmonar a hipoxia.

Estas diferencias de respuestas a hipoxia parece que esta relacionada con la regulación diferencial por hipoxia de los canales de K^+ y de Ca^{2+} voltaje dependientes en los miocitos de arteria pulmonar. Como ha sido descrito, los miocitos de resistencia contienen los canales de potasio con rectificación retardada (K_{DR}) sensibles a O_2 y una gran densidad de canales de Ca^{2+} tipo L en comparación con los miocitos de conducción donde predominan los canales K_{Ca} (Archer y col., 1996; Franco-Obregón y López Barneo, 1996). Además hipoxia puede potenciar la actividad de los canales de

Ca^{2+} en los miocitos de resistencia mientras que inhibe la actividad de los mismos en los miocitos de conducción (Franco-Obregón y López Barneo, 1996; Bakhrarov y col., 1998). Debido a todo esto, la hipoxia inhibe la corriente de K^+ , incrementa la entrada de Ca^{2+} y aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico en los miocitos de resistencia, lo que induce la vasoconstricción de las pequeñas arterias intrapulmonares (Post y col., 1992; Archer y col., 1996; Ureña y col., 1996). Sin embargo, en los miocitos de conducción la falta de los canales de K_{DR} sensibles a O_2 y la inhibición de los canales de Ca^{2+} por hipoxia son posibles mecanismos que causan la vasodilatación descrita en estos miocitos (Archer y col., 1996; Franco-Obregón y López Barneo, 1996; Bakhrarov y col., 1998).

El estudio por lo tanto de la diversidad longitudinal de los miocitos vasculares referente a la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y a la actividad eléctrica aborda un concepto que puede ser importante para explicar la regulación del tono vascular de importancia fisiológica y fisiopatológica evidente.

OBJETIVOS

Como se indicó en “Introducción”, los niveles de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) determinan de forma crítica el estado de contracción del músculo liso vascular. Por lo tanto, es de importancia fundamental el estudio de los mecanismos que regulan la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la forma en que los cambios en los niveles citosólicos del ión afectan a las conductancias iónicas presentes en la membrana de los miocitos arteriales. La fisiología celular de las fibras musculares lisas vasculares es relativamente poco conocida y, concretamente, existe muy poca información acerca de la uniformidad a lo largo del territorio vascular (desde arterias gruesas a las arteriolas) de las respuestas celulares a los diferentes agentes vasoactivos. El objetivo general de este trabajo ha sido el análisis de la fisiología celular en miocitos aislados del árbol arterial pulmonar, prestando atención especial a las diferencias longitudinales, es decir a las variaciones que existen entre los miocitos de conducción (localizados en el tronco arterial pulmonar y ramas primarias) y de resistencia (localizados en ramas terciarias y cuaternarias). Los objetivos específicos han sido los siguientes:

1. Estudio de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bien espontáneas o inducidas por agonistas, y de la regulación de su frecuencia y amplitud por los cambios del nivel basal de Ca^{2+} .
2. Caracterización de la participación de los reservorios intracelulares de calcio en la génesis y regulación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

3. Análisis de las diferencias en la génesis de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en los miocitos pulmonares dependiendo de su localización a lo largo del árbol vascular pulmonar (miocitos de resistencia y de conducción).
4. Estudio de la regulación diferencial por el AMPc de las oscilaciones en los miocitos de resistencia y de conducción.
5. Estudio de las corrientes iónicas transmembranarias reguladas por las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en los diferentes tipos de miocitos pulmonares. Caracterización de los canales de Cl^- y K^+ de la membrana activados por el Ca^{2+} y determinación de la importancia fisiológica de éstos.

MATERIAL Y METODOS

1. Preparación de las células

Para la realización de este trabajo se utilizaron células aisladas de músculo liso de la arteria pulmonar de conejo, procedentes del tronco (arterias de conducción) o de la 3ª y 4ª ramas (arterias de resistencia). Las arterias se extrajeron del pulmón derecho o izquierdo y se trataron enzimáticamente para obtener los miocitos que posteriormente se utilizaron en los experimentos.

1.1. Cirugía y obtención de la arteria pulmonar

Los conejos utilizados eran albinos de la cepa "New-Zeeland" de 1 a 2 Kg de peso. Se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (120 mg/Kg) inyectado en la vena marginal de la oreja. Tras la extracción del pulmón, éste se introdujo rápidamente en el medio fisiológico "Hank" a 4°C (en mM): ClNa 125, ClK 5.36, CO₃HNa 15.5, PO₄HNa₂ 0.34, PO₄H₂K 0.44, Glucosa 10, Sacarosa 1.45, Hepes 10. pH = 7.3, a 20°C ajustado con NaOH. La arteria se separó del tejido pulmonar con las pinzas, procurando tocarla lo menos posible. Desde la parte ventral hacia la dorsal del pulmón se separó primero la vena pulmonar, a continuación el bronquio, que es más grueso y más blanco, y al final se retiró el tronco de la arteria junto con sus pequeñas ramificaciones en las que se divide a lo largo del pulmón.

1.2. Tratamiento enzimático y dispersión celular

Una vez extraída la arteria del pulmón, se eliminó de su cara externa e interna la adventicia y el endotelio respectivamente. A continuación se cortó en pequeños trozos de 2-3 mm que se guardaron durante unas 14 horas a 7°C en solución “Hank” con 0.5 mg/ml de papaína, 0.2 mg/ml de colagenasa tipo IA y 0.16 mg/ml de albúmina bovina. A veces se usó un protocolo más rápido para dispersar las células, consistente en guardar la arteria en concentraciones más altas de enzimas (1.2 mg/ml de papaína, 0.8 mg/ml de colagenasa tipo IA y 0.16 mg/ml de albúmina bovina) a 7°C durante 6 horas. En cualquier caso, tras el periodo de incubación con las enzimas el tejido se dispersó en 1 ml de “Hank” con enzimas a 37°C durante 15 min mediante un agitador mecánico. Cuando se detectaron las primeras células, se transfirieron a una solución con 10 mg/50 ml de albúmina bovina disuelta en “Hank” a 37°C y se dispersó el tejido usando pipetas Pasteur de vidrio cuyas puntas habían sido pulidas previamente con fuego para no dañar las células. La dispersión celular obtenida se depositó sobre unos cubres de vidrio, colocados en el interior de placas de Petri. Con anterioridad, los cubres de vidrio fueron lavados en ácido clorhídrico a 37°C durante 2 horas y sonicados en una solución de etanol. Posteriormente se lavaron con agua desionizada y se trataron con poli-L-lisina (1 mg/ml en 0.15 M Trizma, pH = 8.5), un substrato que favorece la adhesión de las células al vidrio. Transcurridos diez minutos, las células sembradas estaban adheridas a los cubres y se podían utilizar para los registros experimentales.

En este trabajo se estudiaron células de diferentes formas y tamaños, alargadas, semi alargadas y redondas. Para desestimar la posibilidad de que algunas de las células estudiadas pudiesen ser otras que las de músculo liso, se realizó un test inmunocitoquímico con un anticuerpo específico contra la α -actina de las células de músculo liso. Este test consiste en incubar las células dispersadas de la arteria con el anticuerpo, observándose al final de la reacción y gracias a un sistema de revelado, un precipitado de color marrón en las células donde el anticuerpo reconoce a los filamentos de α -actina.

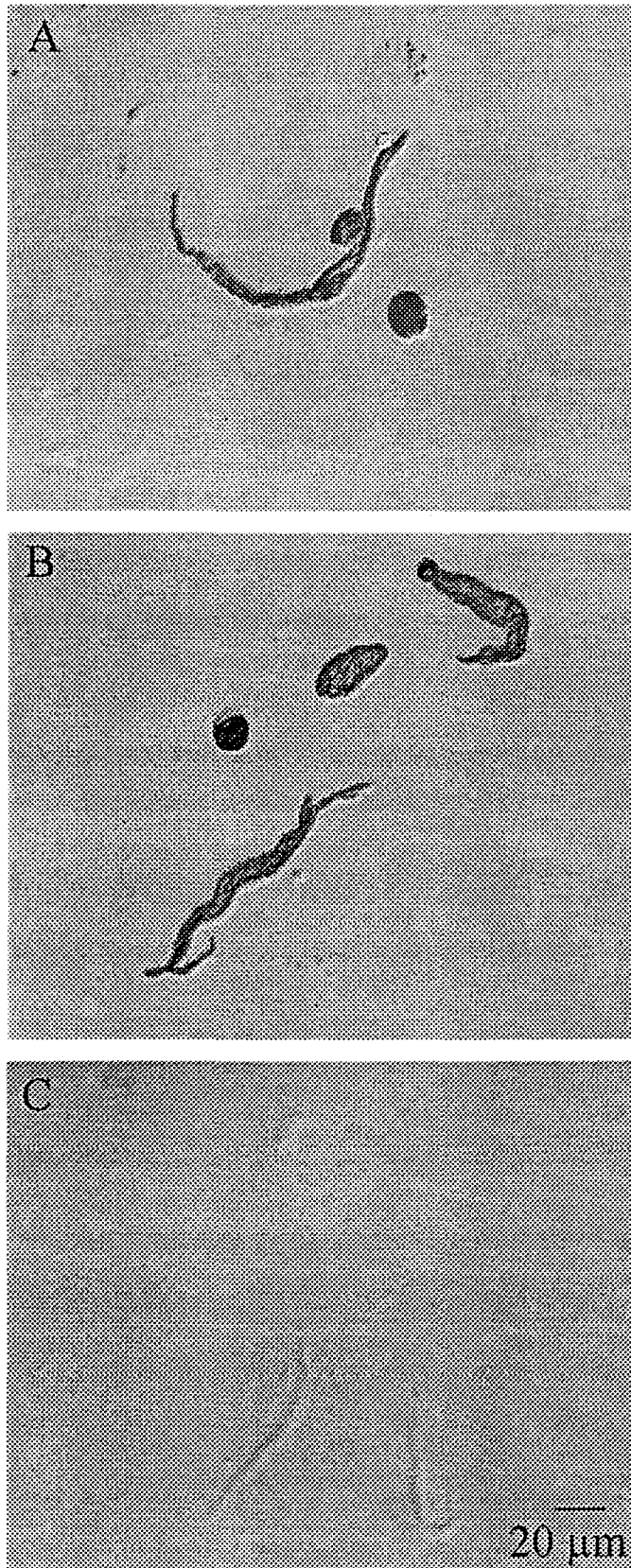


Figura 7. Fotografías de miocitos de resistencia (A) y de conducción (B) marcados con el anticuerpo contra la α -actina. C. Fotografía de miocitos a los que no se aplicó el anticuerpo (control negativo).

El revelado obtenido de la dispersión de las arterias de conducción y de resistencia mostró unas células, de diferentes tamaños y formas, marcadas con el anticuerpo presentando un color marrón. Para asegurarse de la especificidad de la reacción, se llevó a cabo un control negativo, que consistió en seguir el mismo protocolo con la única excepción de no incubar las células en presencia del anticuerpo. En este caso no se vieron células marcadas, lo que confirmó que las células que se marcaron en presencia del anticuerpo eran de músculo liso.

En la figura 7 se representa un ejemplo de miocitos de resistencia (panel A) y de conducción (panel B) marcados con el anticuerpo de la α -actina. Obsérvese como tanto las células alargadas como las contraídas muestran un color marrón. La figura 7C muestra un ejemplo representativo de miocitos de conducción, a los que se hizo el control negativo. En este caso no se observan células teñidas de color marrón como en los casos anteriores.

2. Técnicas de registro

En este proyecto se midió la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en células no dializadas como en células dializadas, usando para ello un indicador fluorescente, que incluido en el citosol, emite una intensidad de fluorescencia que depende de la $[Ca^{2+}]_i$. En otra serie de experimentos se registraron los cambios en la actividad eléctrica de estos miocitos (corrientes iónicas transmembranarias o potencial de membrana) originados por los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$.

2.1. Medida de la $[Ca^{2+}]_i$ citosólico mediante técnicas microfluorimétricas

2.1.1. Uso del Fura-2 como indicador fluorescente

El marcador que se ha utilizado para la medida de la $[Ca^{2+}]_i$ ha sido el Fura-2 (*Molecular Probes, EE.UU.*). Este indicador fluorescente es un derivado del quelante de Ca^{2+} EGTA, cuya intensidad de fluorescencia emitida depende de la $[Ca^{2+}]_i$. La unión del Ca^{2+} al Fura-2 se hace con más afinidad que con otros iones divalentes como el Mg^{2+} y no se une a cationes monovalentes (Grynkiewicz y col., 1985).

La figura 8 muestra el espectro de excitación del colorante en el que se observa cómo para una longitud de onda (λ) de excitación de 360 nm, la fluorescencia emitida por el mismo no depende de la $[Ca^{2+}]_i$ (punto isobéptico). Cuando la λ es superior a este valor,

los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ se acompañan de disminución en la intensidad de fluorescencia emitida. Al contrario ocurre cuando la λ de excitación es inferior a 360 nm. En cualquier caso, la λ de emisión del colorante es cercana a 510 nm.

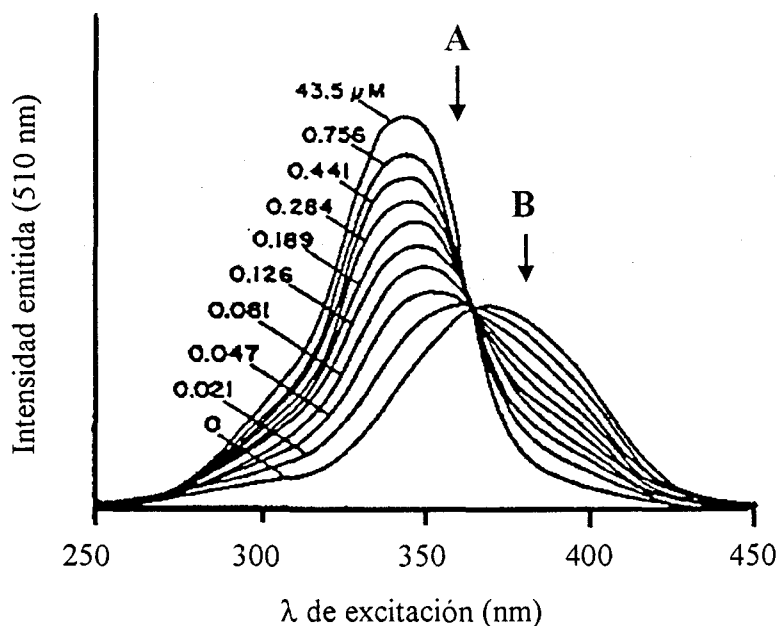


Figura 8. Espectro de excitación del Fura-2 a concentraciones crecientes de Ca^{2+} . Se representa la fluorescencia emitida a 510 nm frente a la longitud de onda de excitación. Las dos flechas hacen referencia a las longitudes de onda de los filtros de excitación empleados en nuestro sistema ($\lambda_A = 360$ nm y $\lambda_B = 380$ nm).

Una característica importante del Fura-2 es la posibilidad de obtener el cociente entre las intensidades de fluorescencia emitidas a partir de dos longitudes de onda de excitación. Esto permite eliminar determinados efectos asociados a cambios en el contenido del indicador en el interior de la célula así como a efectos experimentales no deseados. Además, el Fura-2 tiene un coeficiente de extinción y rendimiento cuántico elevados lo que permite obtener intensidades altas de fluorescencia usando pequeñas concentraciones de indicador (Grynkiewicz y col., 1985). El Fura-2 tampoco presenta un fotoblanqueo muy acusado pudiéndose conseguir registros estables de larga duración (Becker y Fay, 1987). La figura 9 muestra un registro típico de 23 min de duración de una célula que generaba oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas, en el que se aprecia un lento decrecimiento de la fluorescencia emitida por el colorante cuando se excita con las dos longitudes de ondas (F_{360} y F_{380}) debida al fotoblanqueo de las señales, pero apenas afecta a la señal F_{360}/F_{380} que es la que posteriormente se utilizará para la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$.

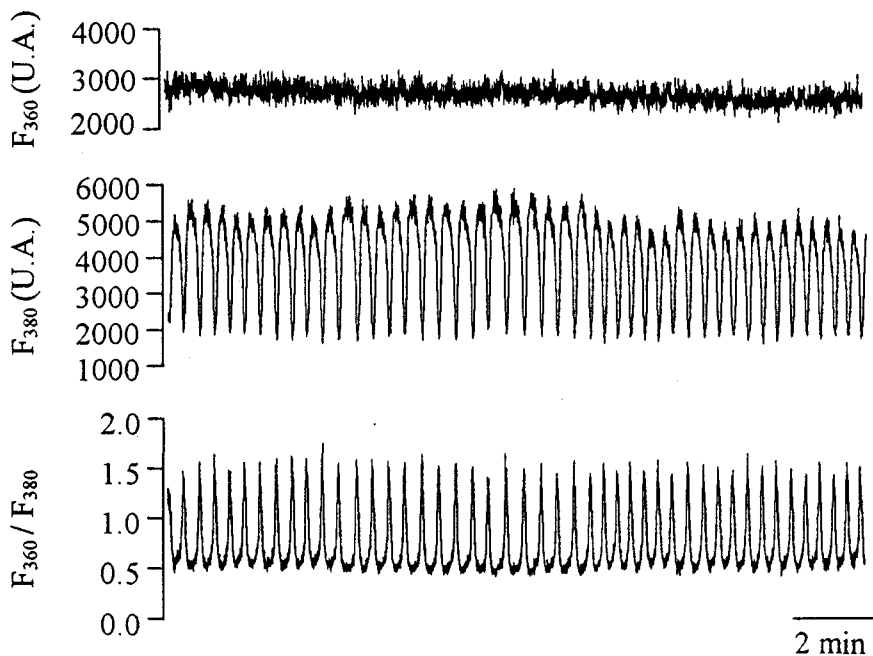


Figura 9. Registro de la fluorescencia emitida por una célula de músculo liso cargada con Fura-2 y excitada con las longitudes de onda de 360 y 380 nm. La fluorescencia se expresa con unidades arbitrarias (U.A.).

El indicador Fura-2 se puede presentar en dos formas, una permeable a través de la membrana plasmática y otra forma salina impermeable. La forma acetoximetil éster del colorante (Fura-2 AM), le permite pasar a través de la membrana plasmática, para que las esterasas intracelulares lo desesterifiquen quedando el producto fluorescente dentro del citosol. No obstante, en algunos tejidos la hidrólisis de la forma éster de la molécula es incompleta (Scanlon y col., 1987) y el colorante se compartimentaliza en orgánulos intracelulares (Highsmith y col., 1986; Oakes y col., 1988). El Fura-2 AM se preparó disolviendo 1 mg del colorante en 1 ml de acetona y se distribuyó en viales de 50 μ l que se introdujeron en una centrifuga de vacío hasta que se evaporó la acetona, posteriormente los viales se almacenaron a la temperatura de -20°C hasta su uso. Para la inclusión del colorante en el citosol, los miocitos se incubaron a temperatura ambiente, durante 30 min, en solución externa estándar con Fura-2 AM a una concentración de 2.5 μM . Para conseguir esta concentración se añadieron a 5 ml de solución estándar, donde se siembran las células, 1.5 μ l de la solución obtenida tras añadir 10 μ l de DMSO a los viales.

Cuando se utilizó la forma salina del Fura-2 para medir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se utilizaron microelectrodos para cargar las células con el colorante. De esta forma se evita el

problema de hidrólisis parcial de la molécula que puede ocurrir cuando se introduce en el citosol en su forma éster. Para su preparación, se añadieron 120 μl de H_2O desionizada a 1 mg de Fura-2 sal y el volumen restante se repartió en 24 viales. El colorante quedó a una concentración de 10 mM y se guardó a 4°C hasta su uso.

2.1.2. Calibración "in vitro" e "in vivo"

La determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se ha llevado a cabo a partir de la expresión:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \beta \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \quad (1)$$

donde R representa el cociente de las intensidades emitidas por el colorante cuando se excita con las longitudes de onda de 360 y 380 nm, R_{\min} y R_{\max} son los valores de R en ausencia y con una concentración saturante de Ca^{2+} respectivamente. K_D es la constante de disociación de la unión Fura- Ca^{2+} y β es el cociente de las intensidades de fluorescencia para excitación a 380 nm obtenido con las soluciones 0 Ca^{2+} y a concentración saturante de Ca^{2+} (Grynkiewicz y col., 1985). Si $K_E = K_D \times \beta$ la expresión anterior queda como:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_E \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \quad (2)$$

El valor de R se determina durante el experimento, pero los valores de R_{\min} , R_{\max} y K_E se calculan en la calibración del sistema. Este proceso se puede hacer utilizando pequeños volúmenes de soluciones semejantes a las del medio intracelular (calibración "in vitro"), o bien dializando las células con soluciones internas (calibración "in vivo"). Cualquiera de las dos calibraciones se debe hacer periódicamente, ya que las características del sistema de registro cambian a lo largo del tiempo, y por lo tanto sus constantes de calibración.

La calibración "in vitro" se llevó a cabo utilizando tres soluciones cuyas composiciones, expresadas en mM, se muestran en la tabla 2. En todas ellas el pH se ajustó cuidadosamente a 20°C a 7.2. En cada caso se colocó sobre la cámara de registro una gota de 2 μl de estas soluciones a las que previamente se había añadido 5 μM de Fura-2 sal. En

primer lugar se enfocó el borde de la gota y se desplazó el campo de visión a una zona sin solución y se canceló la autofluorescencia. A continuación se movió la gota al campo de visión y se registraron las fluorescencias F_{360} y F_{380} , cuyo cociente nos proporcionó los valores de los parámetros R_{\min} y R_{\max} cuando las soluciones que se emplearon fueron las de 0 Ca^{2+} o Ca^{2+} saturante respectivamente. Para la obtención de K_E se procedió igualmente con una gota de la solución con $[\text{Ca}^{2+}]$ conocida (290 nM, tabla 2). Este valor se sustituye en la parte izquierda de la igualdad (2) y conociendo R para esta concentración de Ca^{2+} , así como los valores R_{\min} y R_{\max} obtenidos previamente, se determina K_E . Los valores resultantes de la calibración “in vitro” en nuestro sistema fueron: $R_{\min} = 0.22 \pm 0.02$ (n=3), $R_{\max} = 4.95 \pm 0.27$ (n=3) y $K_E = 1787$ nM.

	Ca^{2+} saturante	0 Ca^{2+}	290 nM Ca^{2+}
ClK	130	130	130
Cl₂Ca	10	-	0.66
Cl₂Mg	1	1	1
Hepes	5	5	5
EGTA	-	10	1

Tabla 2. Soluciones con diferentes concentraciones de Ca^{2+} utilizadas en la calibración “in vitro”. A todas las soluciones se añadió 5 μM Fura-2 sal. Los valores se expresan en mM.

La calibración “in vivo” se realizó con objeto de tener en cuenta los fenómenos que ocurren en el citosol (hidrólisis incompleta, viscosidad del citosol, etc), que no se consideraron con la calibración anterior y que pueden llevar a errores en la estimación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Almers y Neher, 1985; Poenie, 1990). Esta calibración se puede llevar a cabo con ionomicina, que es un antibiótico que forma poros en la membrana celular y equilibra el Ca^{2+} intracelular con el contenido de la solución externa (Thorn, 1995). En nuestro caso, la calibración “in vivo” se realizó usando un electrodo para introducir la solución interna cargada con Fura-2 en su forma salina. Este método, que será descrito con más detalles en el apartado 2.2.1, consiste en acercar un electrodo de vidrio a la membrana y hacer un

sello estable de alta resistencia entre el electrodo y la membrana plasmática. En este momento se cancela manualmente la autofluorescencia en el controlador para compensar la luz ambiental, la de la célula, la de la punta de la pipeta y la del sistema de registro. A continuación, aplicando una presión negativa, se rompe el sello y el contenido del electrodo difunde al interior de la célula. Las tres soluciones usadas en esta calibración se muestran en la tabla 3 y son similares a las soluciones internas utilizadas en los experimentos cuando se dializaron las células, a las que se ha añadido 5 μM de Fura-2 sal (Almers y Neher, 1985; Pacaud y Bolton, 1991).

	Soluciones		
	1	2	3
ClK	130	130	130
Ditris-fosfocreatina	5	5	5
Hepes	5	5	5
Cl₂Mg	1	1	1
ATP	4	4	4
Cl₂Ca	-	6	-
EGTA	10	3	-

Tabla 3. Soluciones internas de registro utilizadas para la calibración “in vivo”. A todas las soluciones se añadió 5 μM de Fura-2 sal. Los valores se expresan en mM.

La figura 10 muestra el curso temporal de las señales registradas en el proceso de obtención de los tres parámetros de calibración. Para la determinación de éstos, se tomaron los valores de las fluorescencias F_{360} y F_{380} al final de cada registro cuando estaban estacionarios y se calculó el cociente R correspondiente a las soluciones usadas con diferentes concentraciones de Ca^{2+} . La figura 10A representa las señales registradas para obtener R_{min} cuando se utilizó la solución 1 (tabla 3). Obsérvese cómo aumentaron progresivamente las fluorescencias F_{360} y F_{380} , cuando el colorante difunde en el citosol tras la aplicación de presión negativa en la pipeta para romper la membrana celular. La determinación de R_{int} se llevó a cabo de manera similar pero con la solución 2 (tabla 3),

mediante un “buffer” de Ca^{2+} con una concentración aparente de 290 nM, suponiendo una K_D para el EGTA a $\text{pH} = 7.2$ de 150 nM (Fig. 10B). $R_{\text{máx}}$ se obtuvo con la solución 3 (tabla 3) cuando se produjo un gran aumento del gradiente electroquímico a Ca^{2+} mediante la hiperpolarización de la membrana desde un potencial de membrana de -50 mV hasta -200 mV (Kim y col., 1998). La $R_{\text{máx}}$ se determinó al final del registro en la fase estacionaria que se consigue al cabo de unos 5 min (Fig. 10C).

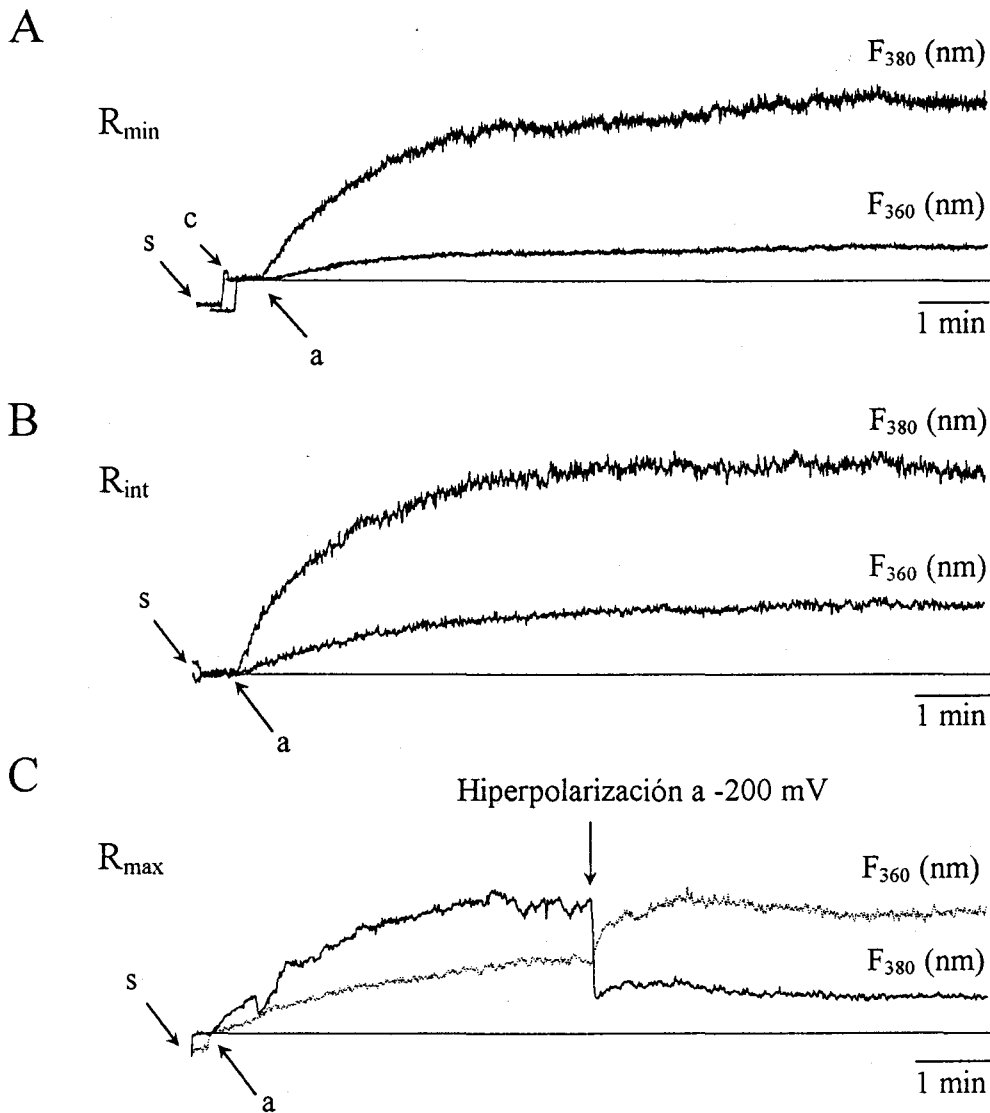


Figura 10. Determinación de los parámetros de la calibración “in vivo” en células dializadas. Las señales representan la fluorescencia emitida por el marcador fluorescente (expresada con U.A.) para la longitud de onda de excitación indicada. Abreviatura: s, momento cuando se establece el sello entre la pipeta y la membrana celular; c, cancelación de la autofluorescencia; a, momento de apertura de la célula y la difusión del Fura al citosol.

Una vez obtenidos estos tres parámetros, se puede calcular K_E utilizando la expresión (2), haciendo $R = R_{int}$ y $[Ca^{2+}]_i = 290$ nM. Los valores de los parámetros de la calibración “in vivo” obtenidos en nuestro sistema son: $R_{min} = 0.18 \pm 0.005$ (n=4), $R_{máx} = 3.45 \pm 0.21$ (n=4) y $K_E = 1801$ nM.

La comparación de la $[Ca^{2+}]_i$ obtenidas utilizando la expresión (2) para valores arbitrarios de R y con los parámetros de la calibración “in vivo” (eje de ordenadas) e “in vitro” (eje de abscisas) se muestra en la figura 11. El ajuste entre ambas se ha llevado a cabo mediante la expresión cuadrática de 2º orden, $f(x) = 7.35 \cdot 10^{-4} x^2 + 0.75 x + 64.60$, con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.99$. Para un mismo valor de R, la $[Ca^{2+}]_i$ con los parámetros obtenidos con la calibración “in vivo” es 1.24 a 1.7 veces superior a la determinada con los de la calibración “in vitro”. Resultados similares han sido descritos por otros autores, donde los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ calculados con la calibración “in vivo” eran cercanos al doble de la estimada a partir de la calibración “in vitro”. Esta diferencia puede ser debida al efecto de las condiciones citoplasmáticas (por ejemplo la viscosidad) sobre las propiedades del Fura-2, (Agustine y Neher, 1992). En nuestro caso se han utilizado los resultados de la calibración “in vivo” para determinar la $[Ca^{2+}]_i$ a partir de la expresión (2).

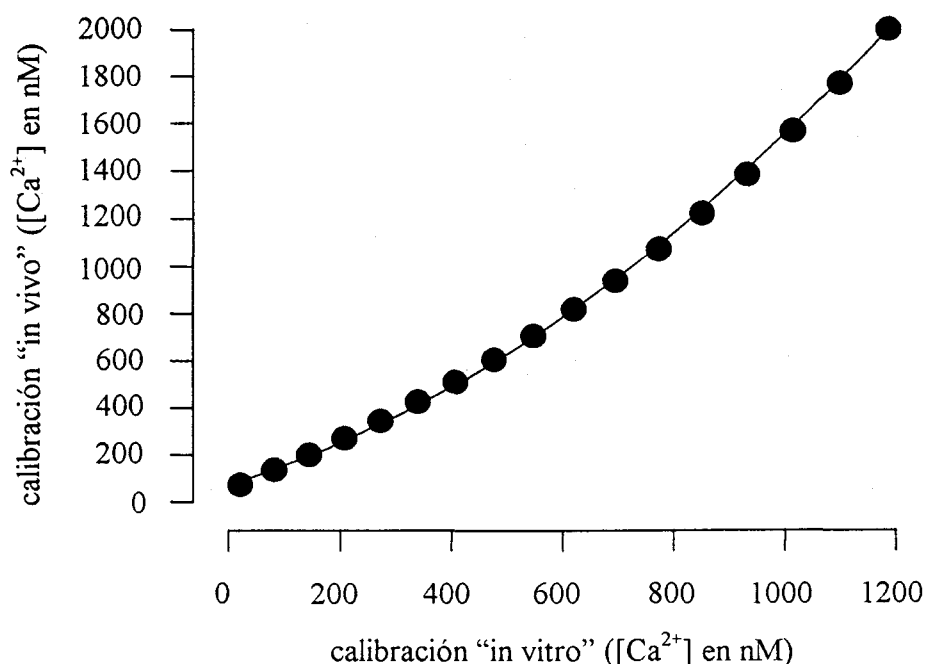


Figura 11. Diagrama comparativo de los valores de la $[Ca^{2+}]_i$ obtenidos con la calibración “in vitro” e “in vivo”.

2.2. Registros electrofisiológicos

En el presente trabajo, además de la medida de Ca^{2+} citosólico en células aisladas se consideró importante conocer la actividad eléctrica que acompañaba a los cambios intracelulares de la $[\text{Ca}^{2+}]$. Por ese motivo se hicieron experimentos electrofisiológicos usando el amplificador EPC-7 (*List Electronics, Alemania*) para la medida de corrientes iónicas en modo de fijación de voltaje (“voltage-clamp”), o la determinación del potencial de membrana en modo de fijación de corriente (“current-clamp”) (Hamill y col., 1981).

2.2.1. Técnica de fijación de voltaje

En la figura 12A se muestra un esquema del dispositivo electrónico empleado en la técnica de “patch-clamp” en el modo de fijación de voltaje (“voltage clamp”), usado para registrar la corriente iónica a través de la membrana (I_m), a partir de una señal de entrada (V_{ref}) que controla el potencial de la pipeta (V_p). La señal de salida V_s , obtenida de un convertidor corriente/voltaje (I/V), permite determinar I_m a partir de la expresión:

$$I_m = -(V_{\text{ref}} - V_s) / R_r$$

donde $R_r = 500 \text{ M}\Omega$, es la resistencia de retroalimentación del convertidor corriente-voltaje. Al inicio del experimento se aplica en V_{ref} un pulso de 10 mV de amplitud y 10 ms de duración que origina la señal V_s . Esta señal, que se monitoriza en un osciloscopio, presenta dos transiciones al inicio y al final del pulso, como consecuencia de los componentes capacitativos del sistema cuando el electrodo se encuentra fuera del baño que contiene los miocitos (Fig. 12A). Cuando se introduce el electrodo en el baño (Fig. 12B), se cierra eléctricamente el circuito entre el electrodo de registro y el electrodo de referencia (E_{ref}), generándose una corriente. A partir de la amplitud de V_s y de los demás parámetros conocidos, se puede determinar la resistencia del electrodo mediante la expresión:

$$R_e = \frac{V_{\text{ref}} \times R_r}{V_s - V_{\text{ref}}}$$

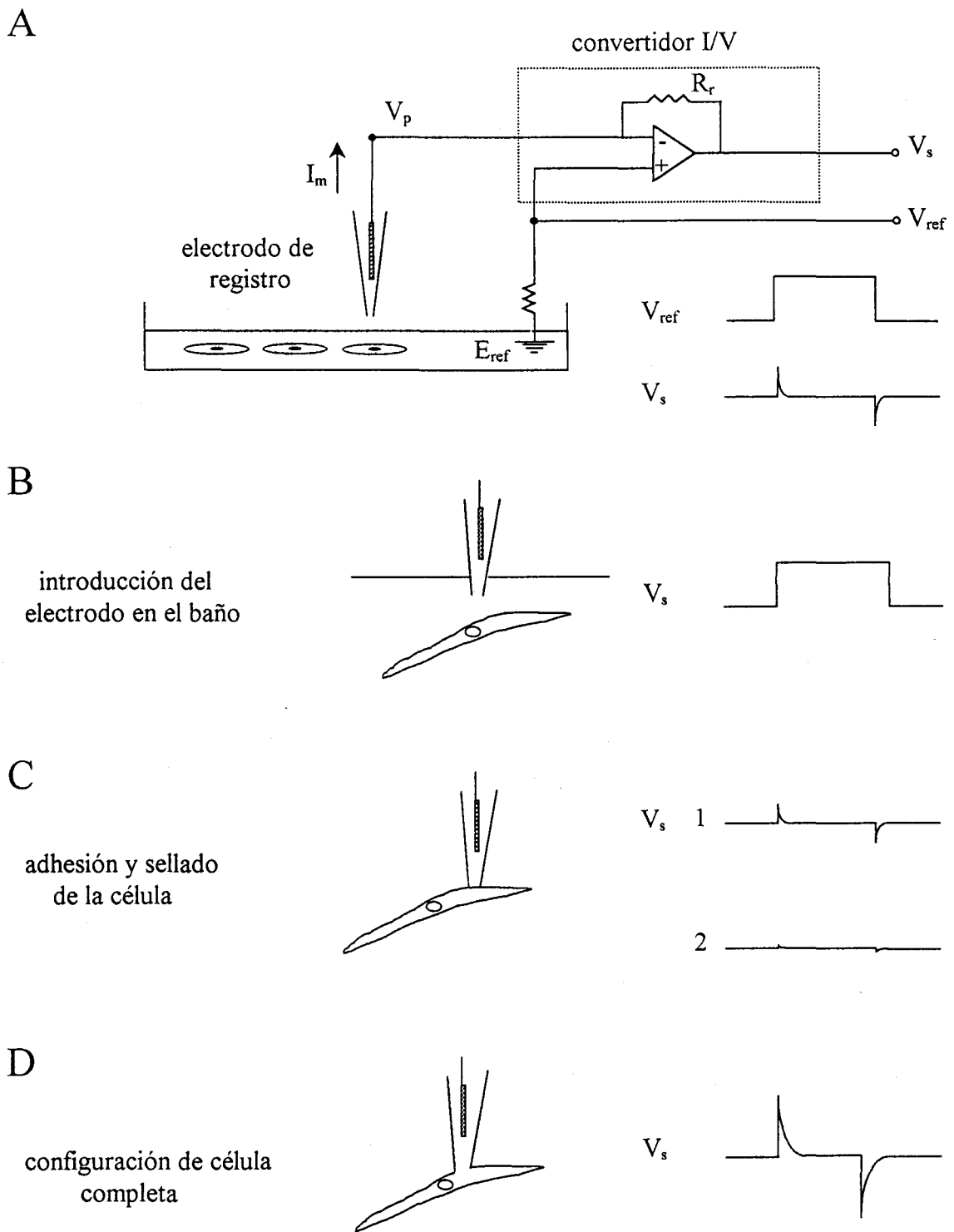


Figura 12. A. Esquema del dispositivo general de registro, modo fijación de voltaje. B, C y D representan los diferentes pasos seguidos hasta llegar a la configuración de célula completa (véase texto para más detalles).

Una vez en el baño y gracias a un micromanipulador se procede a la aproximación del electrodo a la célula aplicando al mismo tiempo una presión positiva al interior de la micropipeta para evitar que se ensucie la punta.

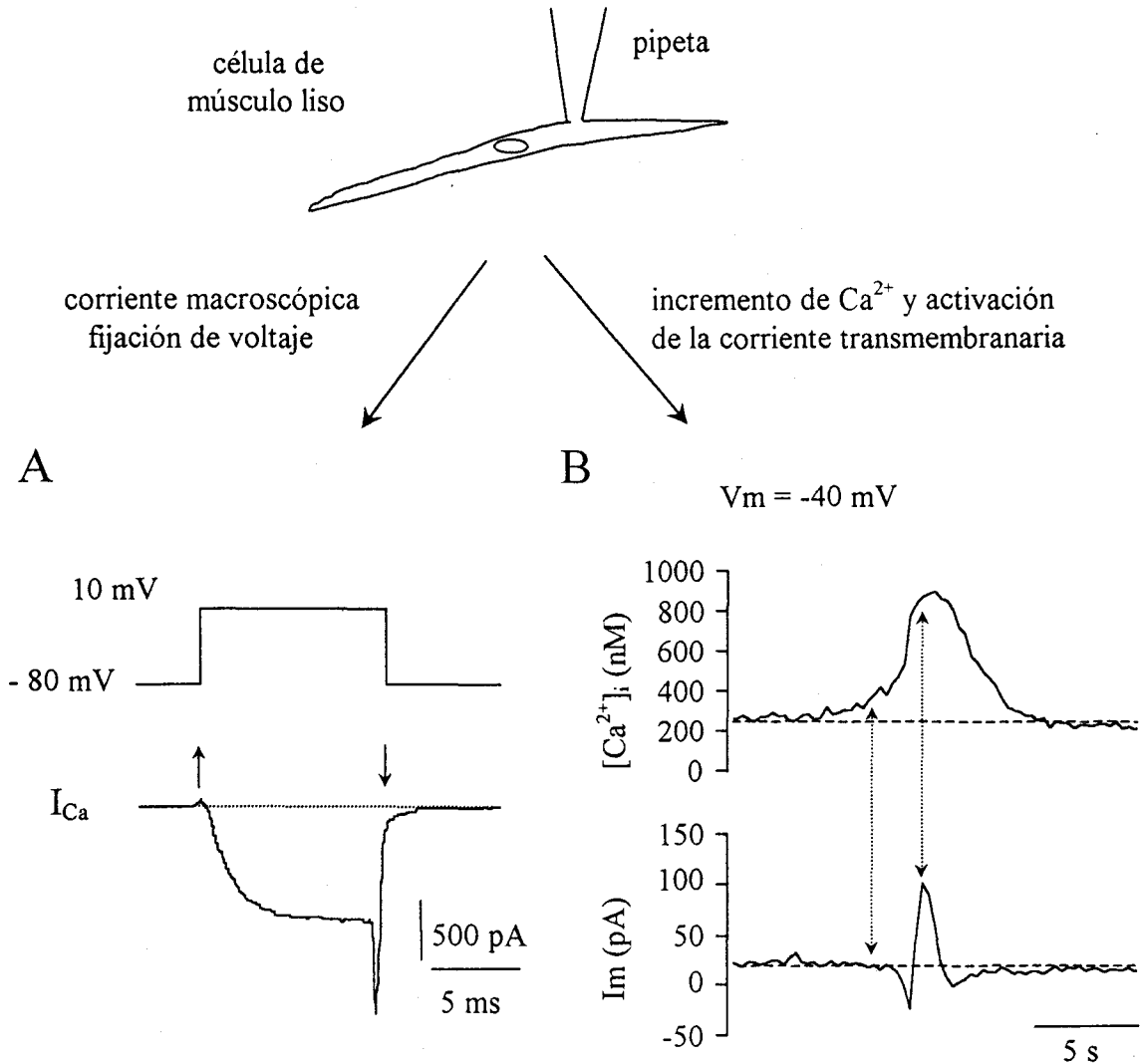


Figura 13. Registros obtenidos con la configuración de célula completa en el modo de fijación de voltaje. A. Registro de una corriente macroscópica de Ca^{2+} tras la despolarización del potencial de membrana desde -80 mV hasta 10 mV (solución interna "en mM" 130 Cs^+ , 5 EGTA, 5 BAPTA // solución externa "en mM" 10 Ba^+ , 140 NaCl, 2.7 KCl). B. Registro simultáneo de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la corriente a un potencial de -40 mV (solución interna 2, tabla 5 // solución externa estándar, tabla 4).

Cuando se establece el contacto con la célula, configuración de "cell-attached", se produce una resistencia llamada resistencia del sello que se refleja en el osciloscopio como

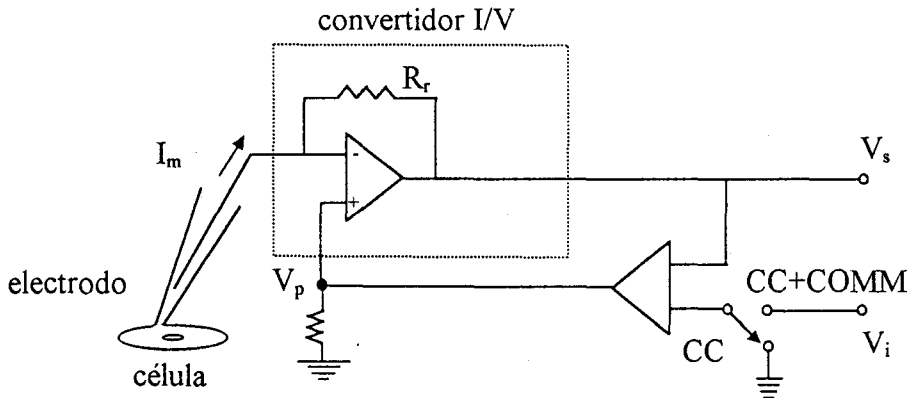
una disminución en la amplitud de la señal de salida V_s (véase Fig. 12C,1). A continuación, se cancelan las transiciones capacitativas manualmente en el amplificador como se muestra en la figura 12C,2. En la siguiente fase se rompe el sello aplicando una presión negativa al interior de la micropipeta consiguiendo la configuración de célula completa “whole-cell”, que se corresponde con un aumento en los componentes capacitativos de la señal V_s (Fig. 12D). Esto permite el acceso al interior de la célula y en pocos segundos el contenido del citoplasma se homogeniza con el contenido de la solución interna de la micropipeta. A partir de esta situación, y tras la cancelación de los componentes capacitativos, se pueden llevar a cabo los experimentos de fijación de voltaje, donde el cambio en V_{ref} provoca los correspondientes cambios en el potencial de membrana y genera corrientes como consecuencia del flujo de iones a través de toda la membrana plasmática.

La figura 13A muestra un registro típico de una corriente iónica macroscópica asociada al flujo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en una célula de músculo liso pulmonar. Esta corriente se consiguió tras aplicar un pulso despolarizante de 10 ms desde -80 hasta 10 mV. La figura 13B muestra un registro continuo de corriente generada en un miocito pulmonar cuando se produce un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ intracelular manteniendo fijo el potencial de membrana a -40 mV. En este caso, la corriente registrada muestra dos componentes de sentidos opuestos, el primero componente entrante coincide con el principio de la subida de la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que el componente saliente se pone de manifiesto cuando el Ca^{2+} alcanza niveles mayores.

2.2.2. Técnica de fijación de corriente

El modo de fijación de corriente (“current clamp”) permite registrar el potencial de membrana manteniendo a cero la intensidad de corriente mediante la retroalimentación entre la señal V_s y el potencial de la pipeta V_p , creándose un seguidor de voltaje de alta impedancia como se muestra en la figura 14A. Una variante de esta configuración es el modo CC+COMM (fijación de corriente + comando). En este caso, la aplicación de una señal V_i hace que la corriente no se mantenga a cero, midiéndose como antes el potencial de membrana que se presenta en la salida V_{COMM} del amplificador.

A



B

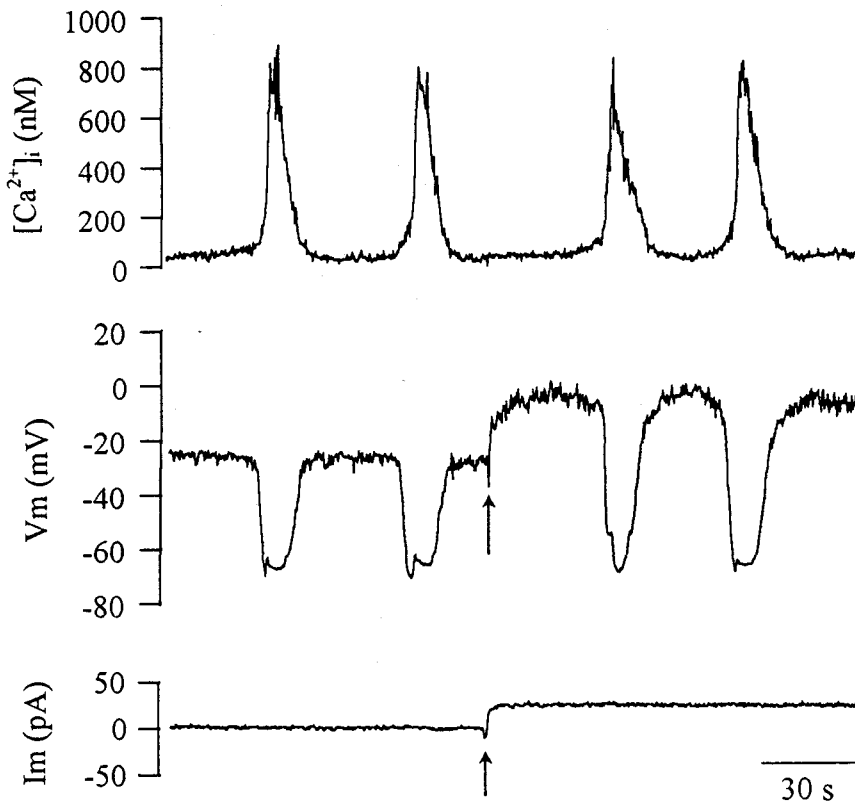


Figura 14. A. Esquema general del dispositivo de registro en modo de fijación de corriente. B. Registro simultáneo de las oscilaciones de Ca^{2+} y los cambios del potencial de membrana. La flecha indica el momento de inyección de corriente en el modo de CC+COMM.

En nuestros experimentos la inyección de corriente se hizo manualmente usando la señal V_{Hold} del amplificador. Los pasos para establecimiento del sello y la configuración de célula completa son idénticos a los descritos en el apartado anterior 2.2.1 (véase Fig. 12A-D). La figura 14B muestra el registro de los cambios en el potencial de membrana como

consecuencia de las transiciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$. Obsérvese que partiendo inicialmente de un potencial de membrana de -25 mV y corriente nula, los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ producen exclusivamente cambios en el potencial de membrana sin afectar la corriente. La flecha representa el instante en que se inyecta corriente, produciéndose un cambio en el potencial de membrana hacia valores cercanos a 0 mV. A continuación cualquier cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ de nuevo produce cambios exclusivamente del potencial de membrana.

2.2.3. Soluciones de registro

En este trabajo se han usado diferentes soluciones externas para bañar las células y soluciones internas, que colocadas dentro de la micropipeta de registro, permiten dializar el interior de los miocitos.

La caracterización farmacológica de las conductancias iónicas, así como el estudio de la liberación de calcio de los almacenes intracelulares, se realizó añadiendo distintos fármacos a estas soluciones, cuya preparación y concentración se citará a lo largo del texto y en los pies de las figuras. Las sales, enzimas, albúmina y demás productos eran de la casa comercial (*Sigma, EE.UU.*).

	Estándar	0 Ca^{2+}	30 K^+
ClNa	140	140	110
ClK	2.7	2.7	30
Cl ₂ Ca	2.5	0	2.5
Cl ₂ Mg	1	4	1
Hepes	10	10	10
EGTA	-	0.5	-

Tabla 4. Composición de las soluciones externas de registro (en mM).

Las soluciones externas de registro empleadas durante los experimentos, se resumen en la tabla 4. Los valores se dan en mmol/litro y el pH = 7.4 ajustado con NaOH a $20^{\circ}C$. La osmolalidad de estas soluciones oscilaba entre 280 y 300 mOsmol/Kg y se midió en un

osmómetro de presión de vapor (*Wescor, EE.UU*). La medida de estos parámetros se repitió cuando se añadió algún producto a la solución.

Por otro lado, las soluciones internas fueron usadas para llenar la pipeta de registro cuando se hicieron experimentos dializando las células. En la tabla 5 se muestra la composición de las soluciones, las cuales se conservaron a -20°C hasta su utilización. Antes de usarlas se añadió el ATP y 0.05 mM Fura-2 sal y luego se ajustó el pH a 7.2 a 20°C . La osmolalidad de las soluciones oscilaba entre 260 y 270 mOsmol/Kg.

	Soluciones			
	1	2	3	4
Ac. Aspártico-K	110	89	-	-
ClK	20	41	130	-
Cl ₂ Mg	1	1	-	-
Hepes	5	5	5	10
Ditrisfosfocreatina	5	5	5	-
ATP	4	4	4	4
ClNa	-	-	-	10
ClCs	-	-	-	120
E_{Cl} (mV)	-49.3	-31	-3.2	-3.2
E_{K} (mV)	-99	-99	-99	-

Tabla 5. Composición de las soluciones internas de registro (expresadas en mM) y los correspondientes potenciales de equilibrio de los iones Cl^- y K^+ determinados a 25°C .

En estas soluciones se alteraron las $[\text{Cl}^-]$ o $[\text{K}^+]$, con objeto de cambiar el potencial de equilibrio para estos iones y estudiar el potencial de reversión de las conductancias presentes en la membrana plasmática. Los potenciales de equilibrio para el Cl^- (E_{Cl}) y para el K^+ (E_{K}) entre la solución externa estándar (tabla 4) y las distintas soluciones internas (tabla 5) se calcularon a partir de la ecuación de Nernst:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_e}{[X]_i}$$

donde R es la constante de los gases, T es la temperatura en °K, z es la carga del ión, F es la constante de Faraday, $[X]_e$ es la concentración del ión en el medio externo y $[X]_i$ es su concentración en el medio interno. El factor RT/F es igual a 25.69 mV a la temperatura de 25°C.

2.2.4. Fabricación de los electrodos de registro

Los microelectrodos se fabricaron a partir de capilares de vidrio usados para la determinación del hematócrito (*Hirschmann Laborgeräte, Alemania*). El vidrio se estiró por calentamiento en dos fases en un estirador vertical (*List Electronics, Alemania*) obteniéndose dos electrodos de puntas muy finas con resistencia entre 3 y 5 megaohmios. Después del estiramiento, los electrodos se pulieron con un arco de platino incandescente, lo que les permitió tener una superficie bastante lisa y regular en la punta, lo cual favoreció la formación de los sellos de alta resistencia.

2.2.5. Medida del potencial de unión líquida

El potencial de unión líquida generado entre las diferentes soluciones internas y la solución externa estándar se midió para determinar el error cometido cuando se registró la corriente o potencial de membrana. Para medirlo se usaron puentes de agar-CLK 3M como electrodo de referencia. El puente de agar consiste en una pipeta rellena con una solución 3M CLK gelesificada por el agar, a la que se introduce un hilo de plata clorurada. El potencial de unión se midió con los electrodos bien clorurados, cuando la lectura del amplificador de “patch-clamp” es estable y siendo el puente la única conexión entre la tierra y el baño (Benedek y Villars, 1979; Ortega-Sáenz, 1998).

El primer paso para medir el potencial de unión, consiste en llenar el baño y la pipeta con la solución interna, luego se conecta el amplificador en modo de fijación de corriente y se ajusta la lectura del amplificador a cero (Fig. 15A). A continuación se cambia la solución del baño por la solución externa (Fig. 15B), en este momento se registra en el amplificador un valor estable que será el valor de la diferencia de potencial de la unión

líquida entre la solución interna y la solución externa. Los valores de los potenciales de unión entre la solución estándar (tabla 4) y las internas 1, 2, 3 y 4 (tabla 5) fueron 8.9 mV, 7.3 mV, 3.5 mV y 3.5 mV respectivamente. Los datos que se presentan en este trabajo no han sido corregidos por estos valores.

A



B

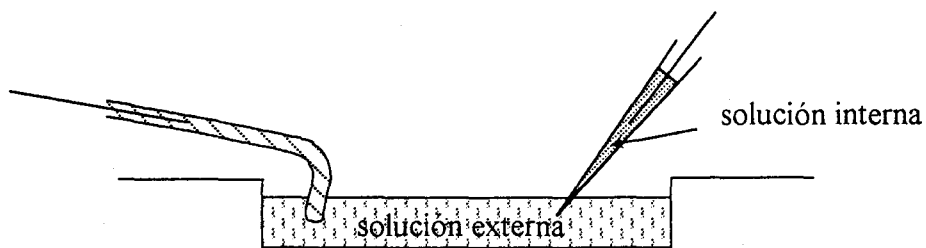


Figura 15. Esquema explicativo del protocolo para la medida del potencial de unión líquida entre dos soluciones de composición iónica distinta.

3. Dispositivo experimental empleado para la medida de la $[Ca^{2+}]$ citosólico y de la actividad eléctrica

Los experimentos se realizaron sobre un microscopio invertido (*Zeiss, Alemania*) equipado con óptica convencional para epifluorescencia (Fig. 16). Las células se excitaron mediante la radiación emitida desde una lámpara de xenón (1) (*Osram XB075 W, Alemania*) atravesando primero un filtro de vidrio antitérmico Schott UG1 (2) que selecciona los fotones con longitud de onda entre 300 y 400 nm. La selección de las dos longitudes de excitación, se realizó con los filtros SWP 357 y BP 380 montados en una rueda que giraba a 5 r.p.s. (3). De esta forma se consiguieron las longitudes de onda cercana a 360 nm y de 380 nm. La vía seguida por la radiación excitadora se muestra en

la figura 16 con línea continua. Esta radiación incide sobre la célula a estudiar a través de un objetivo Plan-Neofluar 40X, AN 0.75 (4). La fluorescencia emitida por el colorante (línea discontinua), con longitud de onda cercana a los 510 nm, se detecta mediante un tubo fotomultiplicador (5) tras ser desviada de su trayectoria en el microscopio y pasar por el espejo dicróico BSP 430 inclinado 45° respecto al haz incidente (6) y por el filtro de emisión LWP 470, (filtro horizontal en posición 6). La selección definitiva de la radiación con longitud de onda cercana a 510 nm se realizó con el filtro SWP 540, situado a la entrada del fotomultiplicador (7). Dos diafragmas colocados en las posiciones 8 y 9 permitieron seleccionar la zona de excitación y la célula objeto de estudio respectivamente.

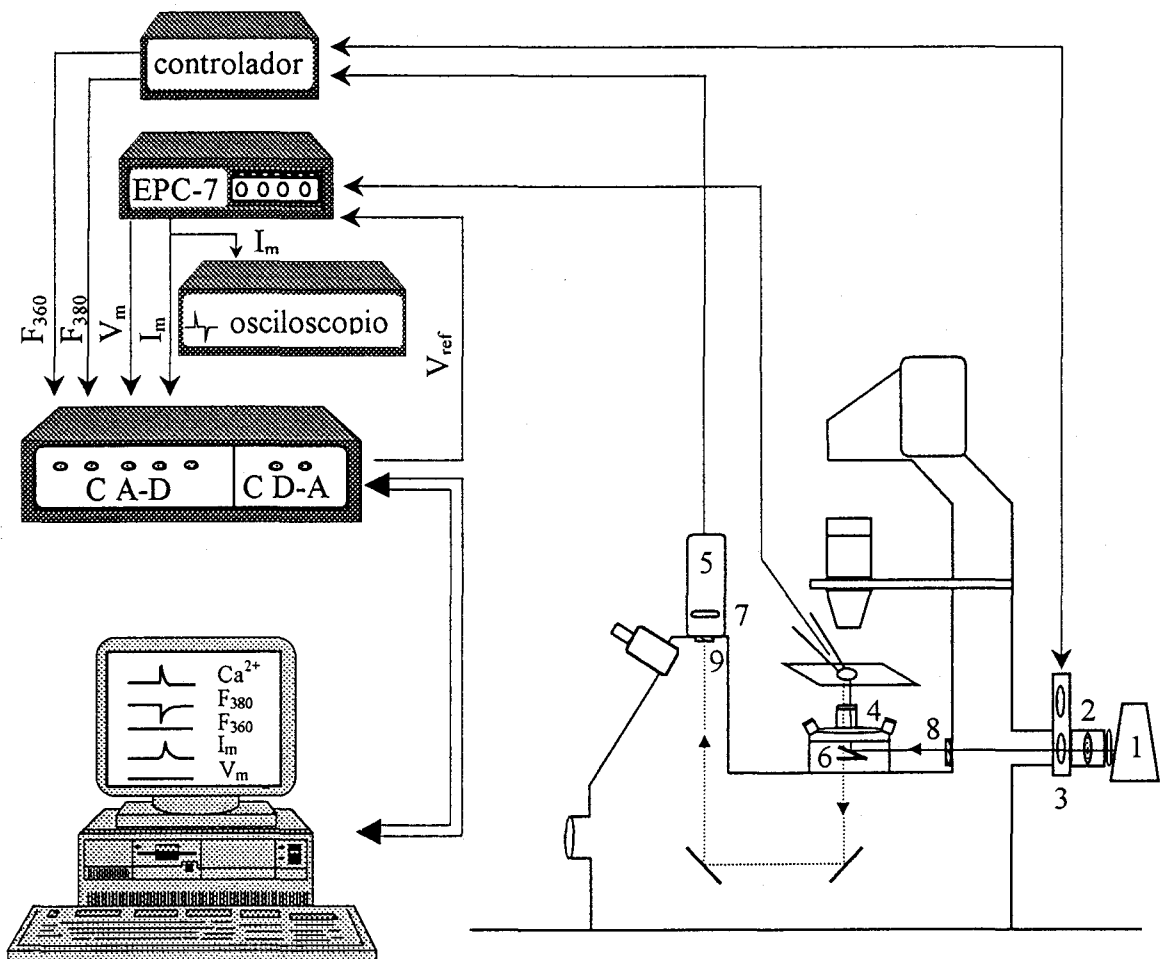


Figura 16. Esquema representativo del dispositivo experimental usado para medir la $[Ca^{2+}]$ intracelular y la actividad eléctrica de los miocitos pulmonares (ver texto para más detalles).

La señal eléctrica del fotomultiplicador se introdujo en el controlador (*Luigs y Neumann, Alemania*) que separa las dos señales que corresponden con las dos longitudes de onda de excitación y las presenta en dos canales de salida, las cuales se digitalizan continuamente (C A-D) con un intervalo entre puntos de 600 ms, en una tarjeta de adquisición (*Indec, EE.UU.*) controlada mediante un ordenador (*IBM PS/230, Reino Unido*). Como se ha descrito anteriormente, la $[Ca^{2+}]_i$ se determina a partir de la relación de estas dos señales y las constantes de calibración del sistema. Estas tres señales se representaron continuamente en la pantalla del ordenador y se almacenaron para su posterior análisis. En los experimentos donde se utilizaron células dializadas, además de las señales anteriores se registraron la corriente iónica (I_m) o el potencial de membrana (V_m), dependiendo del modo de trabajo del amplificador EPC-7. Estas cinco señales se representaron continuamente en la pantalla del ordenador con un intervalo entre puntos de 300 ms y eventualmente se almacenaron para su posterior análisis. Un convertidor digital-analógico (C D-A), proporcionó la señal V_{ref} para controlar el potencial de membrana en la configuración de fijación de voltaje. El osciloscopio permitía visualizar la calidad del sello a lo largo del experimento.

4. Proceder experimental y análisis de resultados

Los miocitos se colocaron en la cámara de registro de unos 0.5 ml de capacidad y se expusieron continuamente a una solución externa. Un conjunto de llaves de paso permitía cambiar la solución que bañaba las células, y que en todo momento era succionada de la cámara de registro mediante una bomba de vacío.

El primer grupo de experimentos se hizo en células no dializadas y cargadas con Fura-2 AM. La medida de la $[Ca^{2+}]_i$ se hizo seleccionando con el microscopio la célula deseada, previa cancelación de la autofluorescencia con el controlador excitando una zona del cubre libre de células.

Para realizar los experimentos en células dializadas, se colocaron las células en la cámara de registro y se situó el electrodo con la solución interna en el "head-stage" del amplificador de "patch-clamp", de forma que el hilo de plata clorurada conecte la solución interna con la entrada negativa del convertidor I/V (véase Fig. 12A). Con la ayuda de un micromanipulador se introduce la micropipeta en el baño y se acerca a la célula, ejerciendo

una suave presión positiva constante para evitar que se ensucie la punta de la micropipeta. Al hacer contacto la pipeta con la superficie celular se hace una leve presión negativa observándose un aumento de la resistencia que alcanza valores de gigaohmios y estableciendo el sello. A continuación se cancela la autofluorescencia en el controlador, que se debe al indicador contenido en la solución interna del electrodo, la autofluorescencia de la célula y la fluorescencia emitida por el sistema (soluciones, componentes ópticos etc.). Para conseguir la configuración de célula completa, se ejerce una ligera succión que conduce a la ruptura del área de la membrana delimitada por la pipeta, accediéndose al interior de la célula. De esta manera, el citosol celular se equilibra con la solución de la pipeta, mientras que el exterior de la célula queda en contacto de la solución del baño. Todo esto se monitoriza mediante un cambio en los componentes capacitativos de la señal representada en el osciloscopio, debido al aumento de la superficie de la membrana celular (véase Fig. 12).

Los datos se dan como media \pm desviación estándar y fueron comparados usando la "t" de Student y las diferencias fueron consideradas significativas a $P < 0.05$. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$).

RESULTADOS

Los resultados que se exponen en este trabajo se han dividido en cuatro apartados (1 al 4). En los dos primeros se describe el estudio realizado sobre la regulación de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]$ citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) en los miocitos del árbol arterial pulmonar. Estos experimentos se llevaron a cabo determinando la $[Ca^{2+}]_i$ con técnicas microfluorimétricas en células aisladas, principalmente sin dializar, procedentes bien de arterias de gran diámetro (de conducción) o de arterias finas (de resistencia). Generalmente se utilizaron células que oscilaban espontáneamente, aunque en determinadas ocasiones las oscilaciones fueron provocadas. Se diseñaron experimentos que permitieron identificar el origen intra o extracelular de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$, utilizando para ello agentes reguladores de la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular y de los mecanismos de liberación y de recaptación del Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (RS) y la mitocondria. En los apartados 3 y 4 se presentan los resultados experimentales obtenidos cuando se utilizan conjuntamente técnicas microfluorimétricas y electrofisiológicas para determinar la actividad eléctrica asociada a los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. Los experimentos se realizaron en la configuración de célula completa con la técnica de “patch-clamp” y se midió la $[Ca^{2+}]_i$ simultáneamente con la corriente iónica transmembranal o el potencial de membrana. Los canales iónicos presentes en la membrana plasmática se identificaron utilizando agentes bloqueantes o determinando el potencial de equilibrio en diferentes condiciones iónicas intra y extracelulares.

1. Oscilaciones de calcio en los miocitos arteriales pulmonares

Los miocitos arteriales pulmonares dispersos muestran oscilaciones espontáneas y mantenidas de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Aunque los mecanismos que provocan estas oscilaciones no se conocen con detalle, se sabe que se originan fundamentalmente por la liberación transitoria de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y que se modulan, en frecuencia y amplitud, por la entrada de calcio del medio extracelular, el potencial de membrana y otras maniobras experimentales (Girad y Clapham, 1993; Franco-Obregón y col., 1995; Prakash y col., 1997).

1.1. Oscilaciones espontáneas o inducidas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico

Se han registrado cambios espontáneos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en una población de 440 células de músculo liso arterial pulmonar, que en algunos casos persistieron hasta 90 min con amplitud casi constante. Un ejemplo ilustrativo de oscilaciones espontáneas se muestra en la figura 17. El panel A representa una secuencia de oscilaciones espontáneas, donde “a” es la amplitud de la espiga de Ca^{2+} , “b” el nivel basal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, e “i” el intervalo entre las oscilaciones, a partir del cual se puede calcular la frecuencia (frecuencia = $1/i$). Los valores promedios del nivel basal de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, la amplitud y frecuencia de las oscilaciones se muestran en la tabla 6.

La espiga de Ca^{2+} señalada con un asterisco, se muestra ampliada en la figura 17B donde se representan las distintas fases de las que consta una oscilación de Ca^{2+} típica. La fase 1, que se denomina pie de la oscilación, se caracteriza por un incremento lento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esta fase generalmente se registra tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo que indica que puede deberse a una pequeña fuga de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Iino y col., 1994). El Ca^{2+} liberado en la primera fase puede inducir un aumento de la excitabilidad del reservorio disparando la liberación rápida de Ca^{2+} representada por la fase 2. La fase 3 refleja la recuperación del nivel basal de Ca^{2+} debido a la participación de procesos activos que bombean el ión hacia el medio extracelular o lo recaptan en los almacenes intracelulares, tras lo cual se repite el proceso (ver Berridge, 1993 y Fig. 4 en “Introducción”).

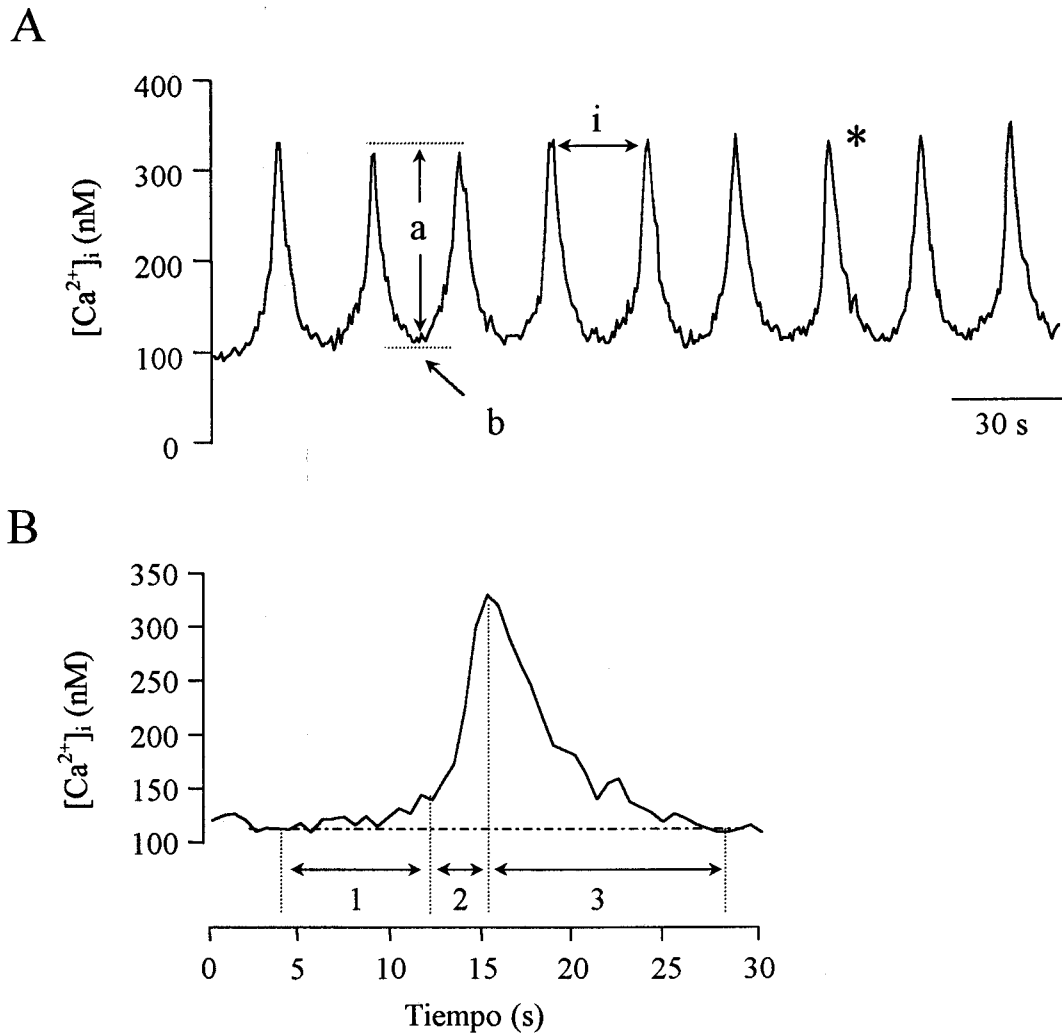


Figura 17. Oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en células de músculo liso vascular. A. Registro de oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$; donde “a” representa la amplitud de la espiga, “b” el nivel basal de Ca^{2+} e “i” el intervalo entre las espigas. B. Representación a diferente escala de la espiga de Ca^{2+} señalada con asterisco en el panel A. Los números indican las diferentes fases de la espiga (ver texto para más detalles).

En los miocitos que no presentaron oscilaciones espontáneas (células silentes), las espigas de calcio se generaron en muchas ocasiones por la estimulación con agonistas. Independiente de su localización, la aplicación extracelular de ATP provocó oscilaciones en el 58% de las células estudiadas ($n=64$; Fig. 18A); la cafeína generó oscilaciones en el 11% de los miocitos ($n=36$; Fig. 18B) y la noradrenalina indujo oscilaciones en el 44% de las células ($n=25$; Fig. 18C). Obsérvese como en todos los casos las oscilaciones persisten durante varios minutos tras el lavado del agonista.

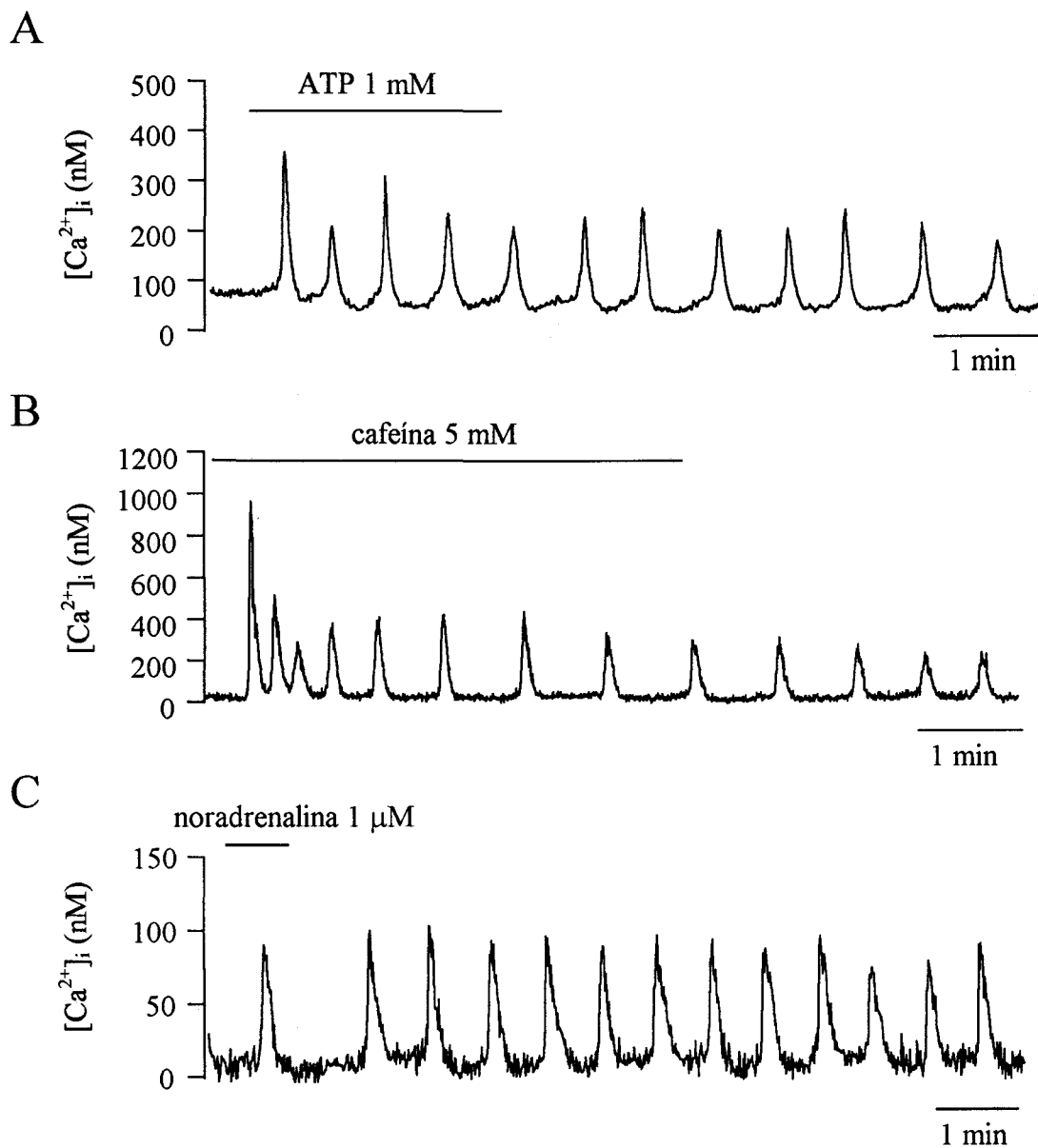


Figura 18. Oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por ATP (A), cafeína (B) y noradrenalina (C).

1.2. Los niveles basales de la $[Ca^{2+}]_i$ citosólico regulan la amplitud y frecuencia de las oscilaciones

Con objeto de estudiar los factores que regulan las características de las oscilaciones de Ca^{2+} , tales como amplitud y frecuencia, se realizaron experimentos en los que se favoreció la entrada del ión del medio extracelular, despolarizando la membrana mediante una solución externa de alta $[K^+]$, o se limitó la entrada del ión eliminando el Ca^{2+} del medio extracelular. La figura 19A muestra el efecto de una solución de 30 mM K^+ sobre

las oscilaciones espontáneas. La apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, como consecuencia de la despolarización originada por esta solución (Franco-Obregón y col., 1995), provoca un incremento del nivel basal de la $[Ca^{2+}]$ representado por la línea de puntos. Como consecuencia de este efecto se produce una disminución marcada de la amplitud e incremento de la frecuencia de las espigas.

Soluciones	$[Ca^{2+}]$ basal (nM)	Amplitud (nM)	Frecuencia (oscilaciones/min)
Estándar	113 ± 96 (n=34)	200 ± 110 (n=36)	3.1 ± 1.8 (n=33)
30 K ⁺	130 ± 90 (n=9)*	105 ± 81 (n=9)*	5.5 ± 3.8 (n=7)*
0 Ca ²⁺	90 ± 84 (n=25)*	249 ± 110 (n=24)*	1.7 ± 0.8 (n=26)*

Tabla 6. Características de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en condiciones experimentales estándar y cuando se altera la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. Los valores se muestran como la media ± desviación estándar y en paréntesis el número de células estudiadas. * valores significativamente diferentes con respecto a los valores obtenidos en la solución estándar (test de la "t" de Student, $p < 0.05$).

El efecto de la solución externa sin calcio se estudió en 36 células. En 11 casos se produjo la interrupción de las espigas al cabo de 1 min, mientras que en las 25 células restantes el efecto observado fue la disminución del nivel basal de Ca^{2+} , lo que dio lugar a una reducción de la frecuencia, y generalmente, aumentó la amplitud de las oscilaciones (Fig. 19B). Los valores promediados de la amplitud y frecuencia de las oscilaciones en presencia de 30 mM K⁺ y tras la eliminación del Ca^{2+} del medio externo se muestran en la tabla 6. La variación relativa de la frecuencia y de la amplitud de las oscilaciones, producidas por las maniobras experimentales descritas anteriormente, se representa frente a la variación de la $[Ca^{2+}]$ basal en las figuras 19C y 19D respectivamente.

Estos diagramas muestran que los incrementos en la $[Ca^{2+}]$ producen aumentos de la frecuencia de las espigas (Fig. 19C) y una disminución en la amplitud de las mismas (Fig. 19D), mientras que la disminución de la $[Ca^{2+}]$ provoca efectos opuestos. Por lo tanto, la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana es un factor importante en la regulación de las

oscilaciones citosólicas del ión. En otras preparaciones de músculo liso donde se han registrado espigas de Ca^{2+} intracelular, también se ha observado la regulación de la amplitud y frecuencia de las mismas por el flujo de Ca^{2+} transmembranario (Blatter y Weir, 1992; Berridge, 1993; Franco-Obregón y col., 1995; Prakash y col., 1997).

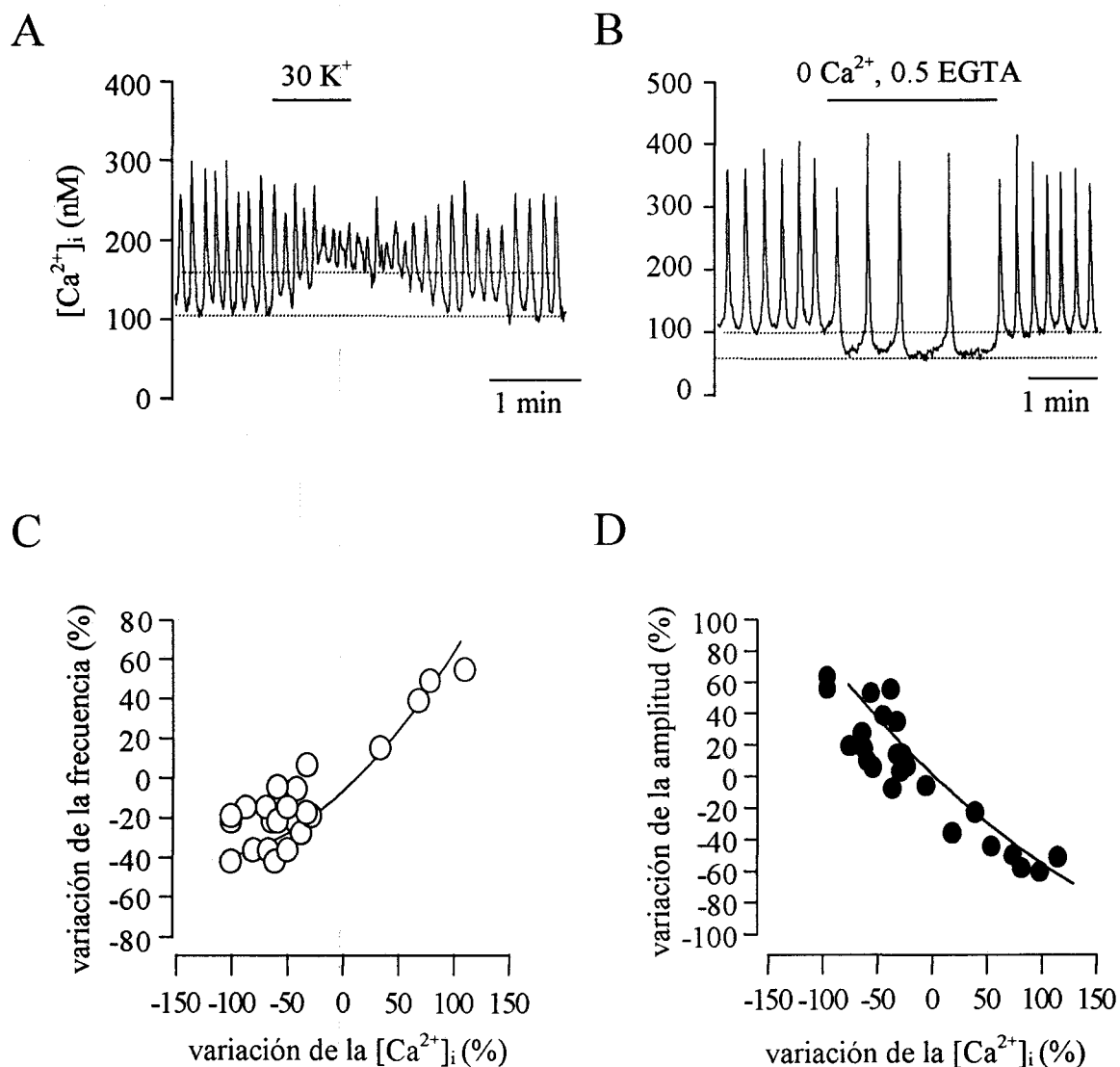


Figura 19. Modulación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por el flujo de Ca^{2+} a través la membrana plasmática. A y B representan las variaciones de la amplitud y frecuencia de las oscilaciones por cambios en la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. En C y D se muestran los ajustes de la variación de la frecuencia y amplitud de las oscilaciones frente a los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico. Los resultados se han obtenido del análisis de 24 células.

1.3. El retículo sarcoplásmico participa de forma fundamental en la génesis de las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]$ citosólico

Como se indicó anteriormente, la eliminación de Ca^{2+} del medio externo generalmente no interrumpió las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico y la aplicación extracelular de algunos agonistas (como el ATP, cafeína o noradrenalina) indujo la génesis de oscilaciones en células silentes (véase Fig. 18). Estas observaciones sugerían que las oscilaciones tienen un origen fundamentalmente intracelular (de reservorios localizados en el retículo sarcoplásmico y/o la mitocondria), por lo que se diseñaron experimentos para determinar de forma precisa su origen.

Existen evidencias experimentales que sugieren la participación de la mitocondria en la regulación de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico inducido por $InsP_3$ en ovocitos de *Xenopus* (Jouaville y col., 1995) así como una estrecha relación espacial entre el retículo sarcoplásmico y la mitocondria en células HeLa, llegando a contactar los dos organelos en algunas localizaciones (Rizzuto y col., 1998; Duchen, 1999). Para estudiar la participación de la mitocondria en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico se realizaron experimentos en los que se inhibió la liberación y la recaptación de Ca^{2+} en la mitocondria mediante agentes farmacológicos. La exposición de los miocitos durante 3 min a rojo de rutenio, un inhibidor del uniportador de Ca^{2+} , no produjo un efecto apreciable sobre las espigas en la mayoría de las células estudiadas, aunque en algunos casos (en 2 células de 10) se observó un bloqueo completo en la actividad oscilatoria de Ca^{2+} . Se hicieron también experimentos en miocitos dializados con solución interna de registro conteniendo $40 \mu M$ de rojo de rutenio. En estas condiciones se registraron oscilaciones espontáneas en 4 células, con características semejantes a las registradas en células sin dializar (Fig. 20A). El mecanismo de extrusión de Ca^{2+} por la mitocondria en el que participa el intercambiador Na^+/Ca^{2+} , parece no participar tampoco en la generación de las oscilaciones, ya que la solución interna de registro utilizada no contenía Na^+ . La utilización del protonóforo CCCP a una concentración de $2.5-5 \mu M$, que disipa los gradientes de protones y eléctrico en la mitocondria, produjo el bloqueo irreversible de las espigas de Ca^{2+} en todas las células estudiadas ($n=9$). Como se muestra en la figura 20B, su efecto generalmente se caracterizó por un enlentecimiento de la segunda fase de la espiga que corresponde a la fase de recaptación del Ca^{2+} citosólico. La interrupción de las oscilaciones por el

protonóforo puede ser debido a la producción de radicales libres o al descenso de ATP, ya que la aplicación externa de 2 $\mu\text{g/ml}$ de oligomicina, inhibidor de la fosforilación oxidativa y de la síntesis de ATP, también produce la interrupción de las oscilaciones en el 70% de los casos estudiados ($n=6$).

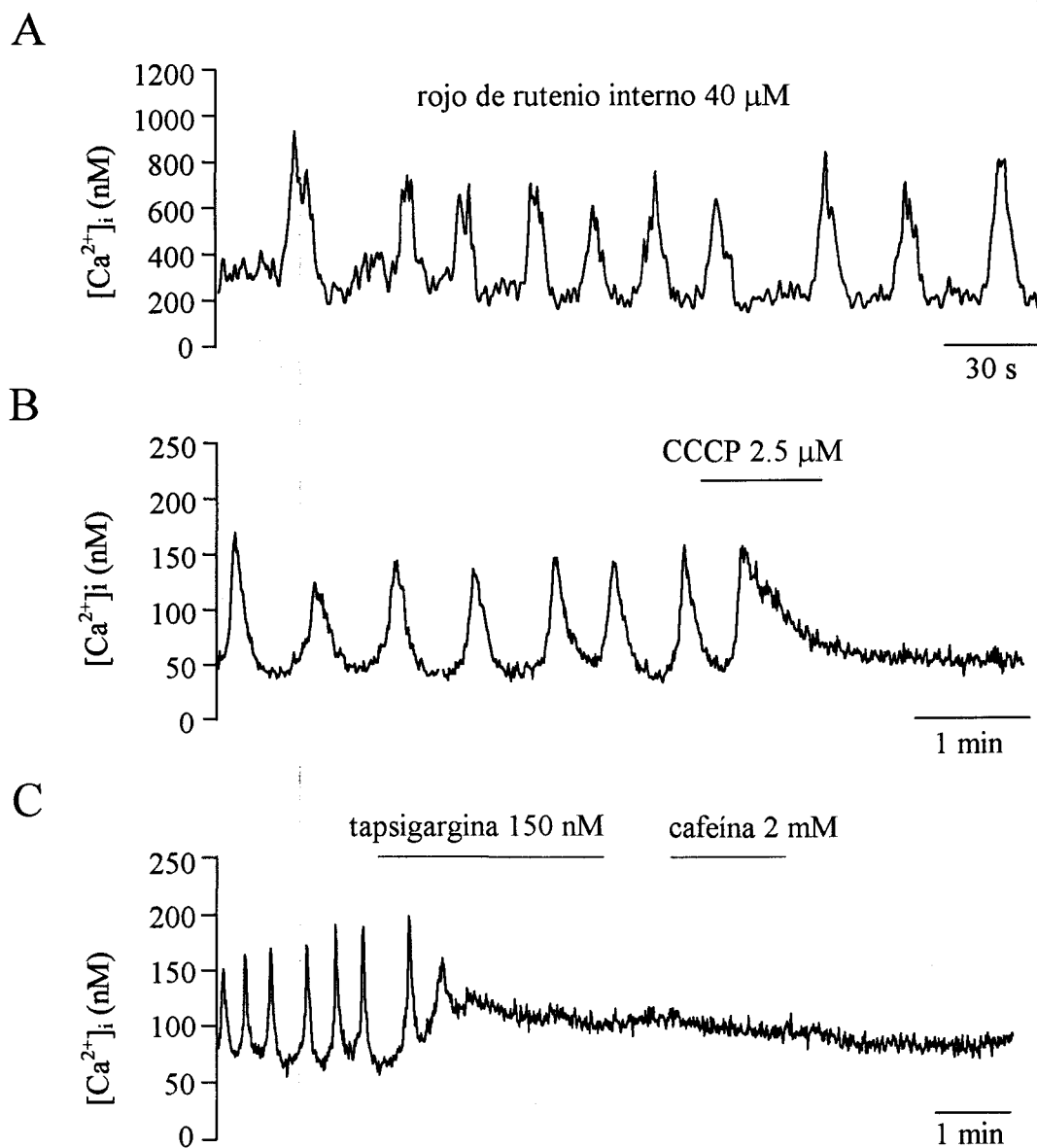


Figura 20. Papel de los almacenes intracelulares de Ca^{2+} en la generación de las oscilaciones. A. La inhibición del uniportador de la mitocondria, tras la diálisis durante 20 min de la célula con una solución interna que contiene rojo de rutenio, no previene la generación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. B. La disipación del gradiente de protones de la mitocondria por el CCCP bloquea irreversiblemente las oscilaciones. C. Interrupción de las oscilaciones mediante la inhibición de la ATPasa cálcica del retículo sarcoplásmico por la tapsigargina.

El papel desempeñado por el retículo sarcoplásmico en la actividad oscilatoria se puso de manifiesto utilizando tapsigargina, un inhibidor de la recaptación de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico por la ATPasa cálcica (Thapstup y col., 1990; Sagara, y col., 1991). Como se muestra en la figura 20C, la aplicación externa de tapsigargina provocó la subida de Ca^{2+} entre las espigas y bloqueó irreversiblemente las oscilaciones en menos de 1 min en todas las células estudiadas (n=5). Obsérvese como la aplicación posterior de cafeína, que libera Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico activando el receptor para rianodina, no produjo incremento de Ca^{2+} , lo que sugiere que, tras el tratamiento con tapsigargina, el reservorio se encontraba vacío.

1.4. Estudio e identificación farmacológica de los receptores regulados por InsP_3 o rianodina en los miocitos de la arteria pulmonar

La liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico se puede llevar a cabo mediante la activación de dos tipos de receptores, el receptor sensible al inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3) (Berridge y Irvine, 1989) y el receptor sensible a rianodina, que a su vez se activa por el Ca^{2+} intracelular (Fleischer y col., 1985). Estos procesos se conocen como el IICR “liberación de Ca^{2+} inducida por InsP_3 ” y el CICR “liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ”.

El receptor para rianodina se estudió utilizando cafeína, que produce su activación aumentando su sensibilidad a Ca^{2+} (Endo, 1977; Yamamoto, 1991). La respuesta a cafeína generalmente produjo una liberación de Ca^{2+} que se caracterizó por una fase inicial rápida seguida por una fase de recaptación más lenta que generalmente se mantenía mientras que la cafeína estuviese presente (Fig. 21A). Como se indicó anteriormente la cafeína fue también capaz de generar oscilaciones de Ca^{2+} en células silentes (ver Fig. 18B).

El receptor sensible a cafeína se caracteriza por su gran afinidad a la rianodina, una toxina que a concentraciones superiores a 10 μM , se une al receptor y lo mantiene en un estado abierto irreversible (Fleischer y col., 1985). El efecto inhibitor de la rianodina es dependiente de su uso, es decir, no ejerce efecto mientras no se estimule el receptor (Rousseau y col., 1987). En la figura 21A se muestra que la aplicación externa de 20 μM rianodina durante 6 min, entre dos estímulos de cafeína, no produjo el bloqueo esperado sobre la señal de Ca^{2+} . Sin embargo, cuando la exposición a cafeína se hizo en presencia de rianodina, se observó una disminución de la amplitud de la señal generada por

aplicaciones sucesivas de cafeína (Fig. 21B). Nótese que el bloqueo se observa con sólo 3 min de exposición a rianodina. Para estudiar con más detalle el efecto de la rianodina sobre la liberación de Ca^{2+} provocada por la cafeína, se llevaron a cabo experimentos aplicando repetidamente, cada 2 min, 10 mM de cafeína en ausencia y presencia de rianodina.

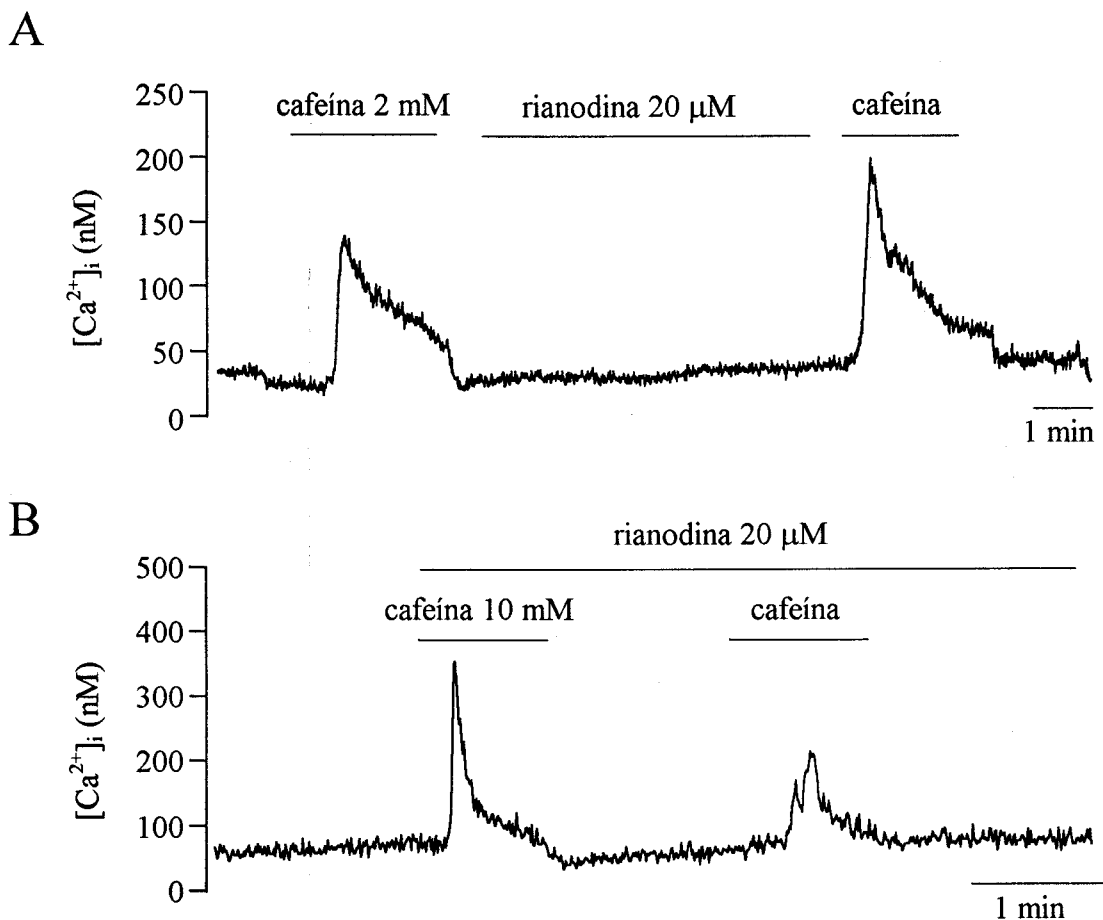


Figura 21. Efecto de la aplicación extracelular de rianodina (20 μM) sobre la liberación de Ca^{2+} producida por cafeína (2-10 mM). A. La rianodina no inhibe la liberación de Ca^{2+} mientras no se active el receptor. B. El efecto bloqueante de la rianodina se produce cuando está presente durante la activación de su receptor.

La figura 22A muestra las respuestas de amplitud similar que se registraron tras el estímulo repetido con cafeína y en ausencia de rianodina. La aplicación de este protocolo experimental a la misma célula pero en presencia de rianodina, proporcionó incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con amplitud decreciente, quedando el reservorio sin Ca^{2+} tras la cuarta aplicación de cafeína (Fig. 22B).

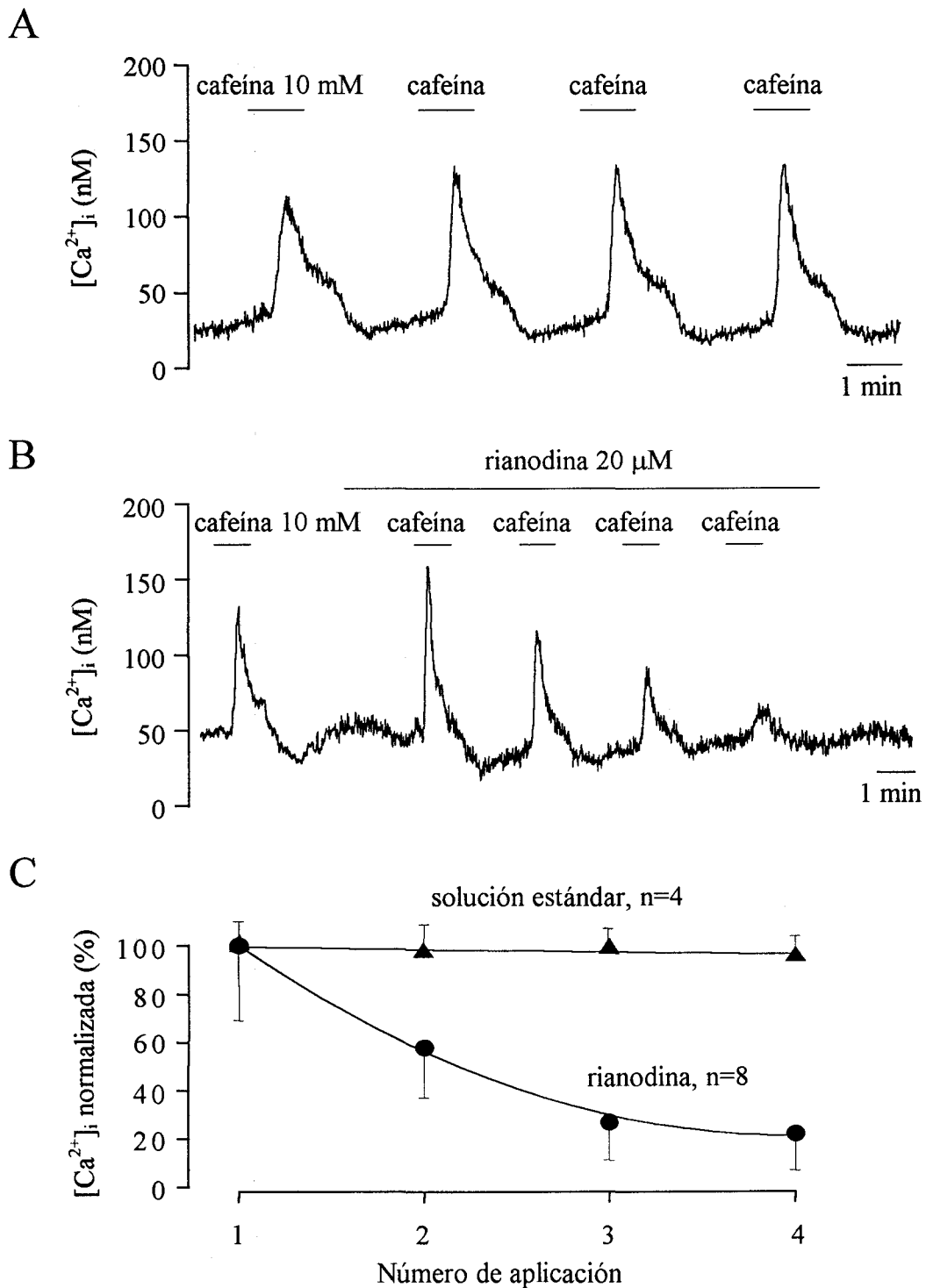


Figura 22. Efecto de la rianodina ($20 \mu\text{M}$) sobre la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico inducida por cafeína (10 mM). A. Espigas de Ca^{2+} de similar amplitud generadas por la aplicación repetitiva de cafeína. B. Disminución de las respuestas a cafeína en presencia de rianodina. C. Representación del promedio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ normalizada frente a las sucesivas aplicaciones de cafeína en solución estándar (triángulos) y en presencia de rianodina (círculos). Los valores obtenidos en presencia de rianodina se ajustan a una regresión lineal de segundo orden con un coeficiente de correlación $r^2 = 0.99$.

En la figura 22C se representa el promedio normalizado, respecto al valor máximo, de la amplitud de la oscilación de $[Ca^{2+}]$ en varias células frente al número de la aplicación de cafeína, en solución externa estándar y en presencia de rianodina. La respuesta a cafeína en la primera solución (triángulos) apenas varía con las sucesivas aplicaciones, mientras que la respuesta a cafeína en presencia de rianodina (círculos) va disminuyendo de amplitud con la estimulación repetida.

El estudio de los receptores del retículo sarcoplásmico sensibles al $InsP_3$ se llevó a cabo mediante la aplicación externa de ATP, agonista de los receptores P_2 -purinérgicos, que gracias a la producción del segundo mensajero $InsP_3$ provoca la movilización de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Dubayk y El Moatassim, 1993). La exposición de los miocitos de la arteria pulmonar a ATP, produjo generalmente un incremento rápido de la $[Ca^{2+}]$, tras cuya recuperación se iniciaron las oscilaciones (ver Fig. 18A). Este efecto también se registró en ausencia de Ca^{2+} externo, aunque tras quitar el estímulo, las oscilaciones persistieron durante menos tiempo que cuando el Ca^{2+} estuvo presente en el medio extracelular (Fig. 23A).

Ya que los miocitos vasculares pulmonares contienen receptores para rianodina e $InsP_3$, estudiamos si la rianodina podía interferir con el receptor sensible a $InsP_3$. En este caso, la liberación de Ca^{2+} generada por la aplicación extracelular de ATP, que supuestamente activa el receptor para $InsP_3$, debería afectarse en presencia de rianodina. La figura 23B muestra un registro en el que el ATP generó oscilaciones de Ca^{2+} que aparentemente no se afectaron por la rianodina, lo que sugiere que su acción en nuestra preparación es bastante selectiva sobre el receptor para rianodina como ha sido descrito por otros autores (Ehrlich y Watras, 1988; Iino y col., 1988). La participación de la vía del $InsP_3$ sobre la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares se puso de manifiesto con la interrupción de las espigas de Ca^{2+} generadas por ATP cuando se inhibió la fosfolipasa C con U-73122 (Smith y col., 1990) (véase Fig. 23C).

Los datos indican que los miocitos procedentes de la arteria pulmonar pueden exhibir oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas o inducidas por la aplicación extracelular de ATP, cafeína o noradrenalina y que se generan aunque el medio extracelular no contenga Ca^{2+} . Esto sugiere que las oscilaciones se originan por un oscilador citosólico y que la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular no es fundamental para la génesis de las mismas, aunque participe

en la regulación de la amplitud y frecuencia. Por otra parte, la mitocondria no parece tener un papel relevante en la producción de las oscilaciones aunque la liberación y recaptación del ión por el retículo sarcoplásmico son fundamentales para su producción y mantenimiento. Así mismo, el retículo sarcoplásmico de los miocitos pulmonares contiene los receptores sensibles a rianodina y a InsP_3 y la liberación de Ca^{2+} mediada por ambos receptores se activa mediante la aplicación de cafeína y ATP y se bloquea por rianodina y U-73122 respectivamente.

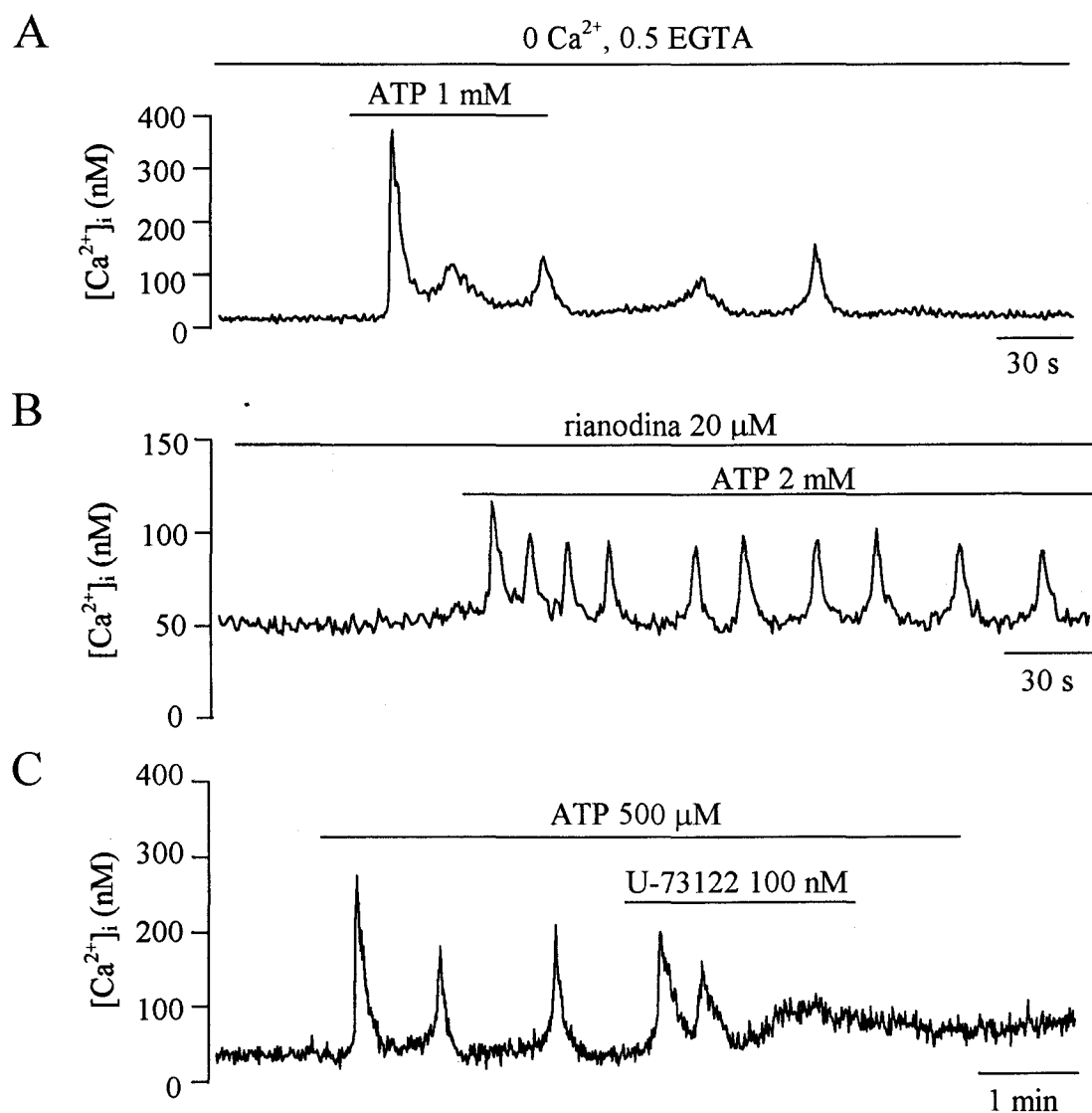


Figura 23. La aplicación extracelular de ATP (0.5-2 mM) induce oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediadas por el receptor sensible a InsP_3 . A. Oscilaciones de Ca^{2+} generadas por 1 mM ATP en ausencia de Ca^{2+} extracelular. B. El ATP (2 mM) induce oscilaciones de Ca^{2+} aunque la rianodina este presente. C. La inhibición de la fosfolipasa C por la aplicación del U-73122 (100 nM) interrumpe las oscilaciones inducidas por ATP (0.5 mM).

2. Diferencias longitudinales en la generación de las oscilaciones de calcio en miocitos del árbol arterial pulmonar

En el apartado anterior se ha mostrado la asociación que parece existir entre las oscilaciones de Ca^{2+} y la liberación del ión del retículo sarcoplásmico. En este apartado se estudió si los receptores responsables de la liberación de Ca^{2+} al citosol (sensibles a InsP_3 y a rianodina) participan de forma diferencial en la génesis de las oscilaciones en los miocitos localizados en regiones distintas del árbol arterial pulmonar. Para este fin, se estudiaron separadamente los miocitos procedentes de arterias de conducción (tronco y ramas primarias) y los miocitos de resistencia (dispersados de ramas terciarias y cuaternarias), exponiéndose a la misma concentración de rianodina y U-73122. Los resultados obtenidos indican que los efectos dependen de la localización longitudinal de los miocitos.

2.1. Las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} de los miocitos de resistencia están mediadas fundamentalmente por el receptor para rianodina

Las oscilaciones de Ca^{2+} que presentaban los miocitos de resistencia mostraron en general una gran sensibilidad a rianodina y poca sensibilidad al U-73122. La aplicación extracelular de 20 μM rianodina bloqueó irreversiblemente las oscilaciones espontáneas en 18 de los 21 miocitos de resistencia estudiados, en menos de 6 minutos (tiempo suficiente para bloquear las oscilaciones mediadas por el receptor para rianodina, véanse Fig. 22B y Fig. 24A).

Para estudiar la participación del receptor para InsP_3 en la generación de las espigas de Ca^{2+} , se realizaron experimentos aplicando 400 nM de U-73122 al medio extracelular para interferir sobre la formación de InsP_3 mediada por la fosfolipasa C. Como se muestra en la figura 24B, el efecto del U-73122 sobre las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en 5 de los 6 miocitos de resistencia estudiados, no es tan dramático como el de la rianodina, ya que aunque generalmente disminuyó débilmente la frecuencia de las oscilaciones, no llegó a interrumpirlas como lo hizo la rianodina. La ausencia de respuesta a cafeína y ATP al final del registro sugiere que tanto el U-73122 como la rianodina han actuado sobre los mecanismos de liberación de Ca^{2+} mediados por el InsP_3R y el RyR respectivamente.

Miocitos de resistencia

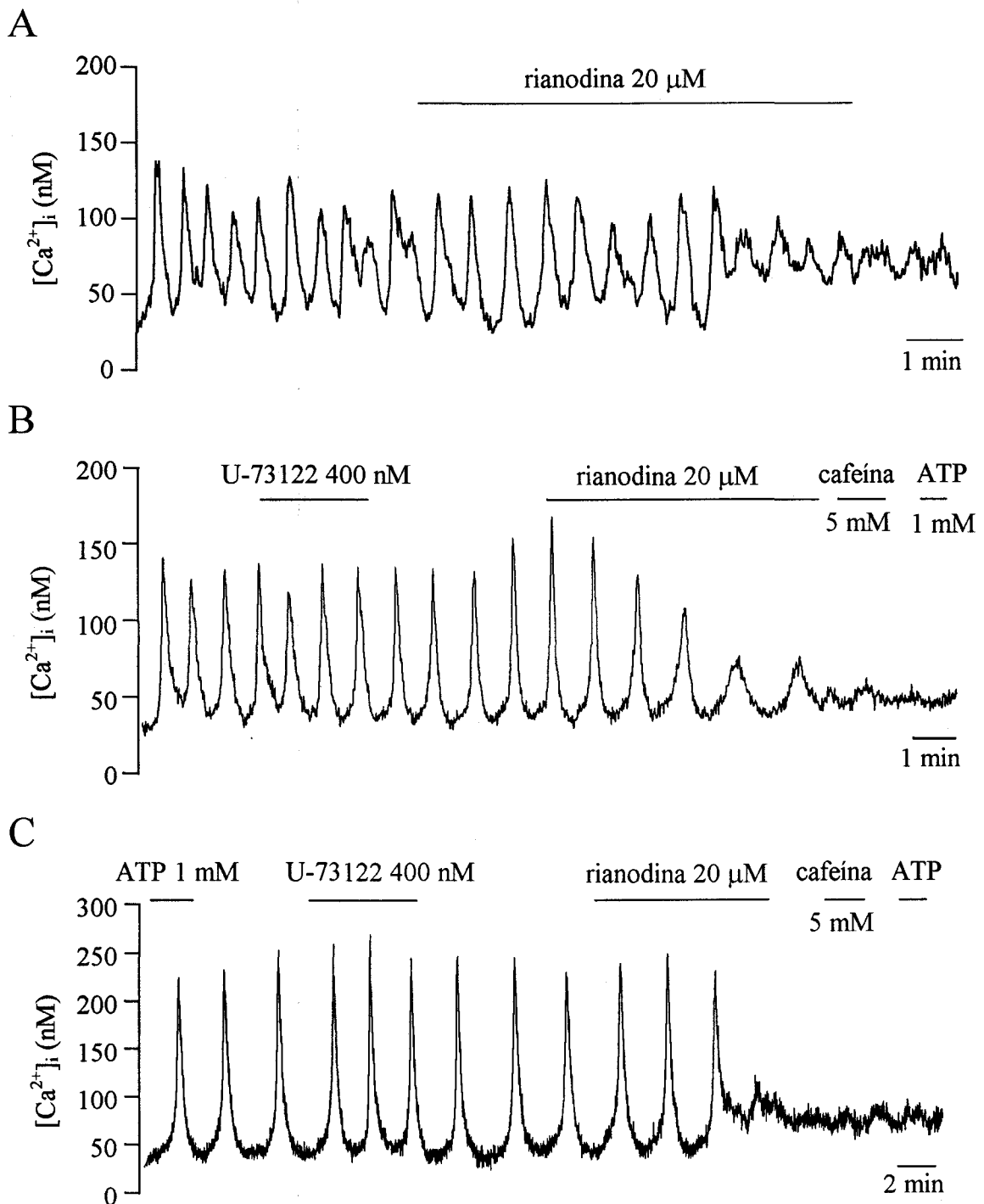


Figura 24. Participación de los receptores para rianodina en la generación de las oscilaciones espontáneas de Ca²⁺ en los miocitos de resistencia. A. Interrupción de las espigas de Ca²⁺ por la aplicación extracelular de 20 μM rianodina. B. Ausencia de efecto de la inhibición de la fosfolipasa C sobre las oscilaciones de Ca²⁺ e inhibición por la rianodina de las oscilaciones. C. Las oscilaciones inducidas por ATP no se bloquean por el U-73122 (400 nM) mientras que la rianodina interrumpe las oscilaciones.

Un efecto cualitativamente similar se obtuvo en las oscilaciones inducidas por la aplicación extracelular de ATP (Fig. 24C). En 2 de los 3 miocitos de resistencia estudiados, el U-73122 no interrumpió las oscilaciones, mientras que la rianodina las bloqueó en todos los casos (n=6). Este último efecto de la rianodina fue observado aunque su aplicación se efectuara en presencia de ATP.

También se hicieron experimentos dializando las células con heparina, para bloquear el receptor para InsP_3 (Supattapone y col., 1988), obteniéndose que 14 de los 17 miocitos de resistencia dializados con 100 $\mu\text{g/ml}$ presentaron oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas, mientras que a concentraciones mayores (3 mg/ml) no se registraron oscilaciones en las 8 células estudiadas (datos no mostrados).

Estos datos indican que en la mayoría de los miocitos de resistencia las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} y las inducidas por agonistas (ATP y otros) parecen estar mediadas fundamentalmente por el receptor para rianodina.

2.2. Las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en los miocitos de conducción están mediadas fundamentalmente por el receptor para InsP_3

Siguiendo el mismo criterio utilizado con los miocitos de resistencia, se estudió el efecto de la rianodina y del U-73122 sobre las espigas espontáneas de Ca^{2+} y las inducidas por ATP en los miocitos de conducción. Los resultados obtenidos fueron opuestos a los anteriores, ya que la aplicación de 20 μM rianodina durante 6 minutos no interrumpió las oscilaciones espontáneas en 18 de los 22 miocitos de conducción estudiados. En la figura 25A se muestra un registro que ilustra cómo la aplicación externa de rianodina durante más de 12 minutos no interrumpió las espigas de Ca^{2+} . Sin embargo, la aplicación del inhibidor de la fosfolipasa C interrumpe las oscilaciones espontáneas en todos los miocitos de conducción estudiados (n=10). La figura 25B muestra este efecto diferencial de la rianodina y del U-73122 sobre las oscilaciones espontáneas en una misma célula. Obsérvese que las oscilaciones permanecen aunque la rianodina está presente, mientras que se bloquean en presencia del inhibidor de la fosfolipasa C, siendo este resultado opuesto al descrito en los miocitos de resistencia (véase Fig. 24B).

Miocitos de conducción

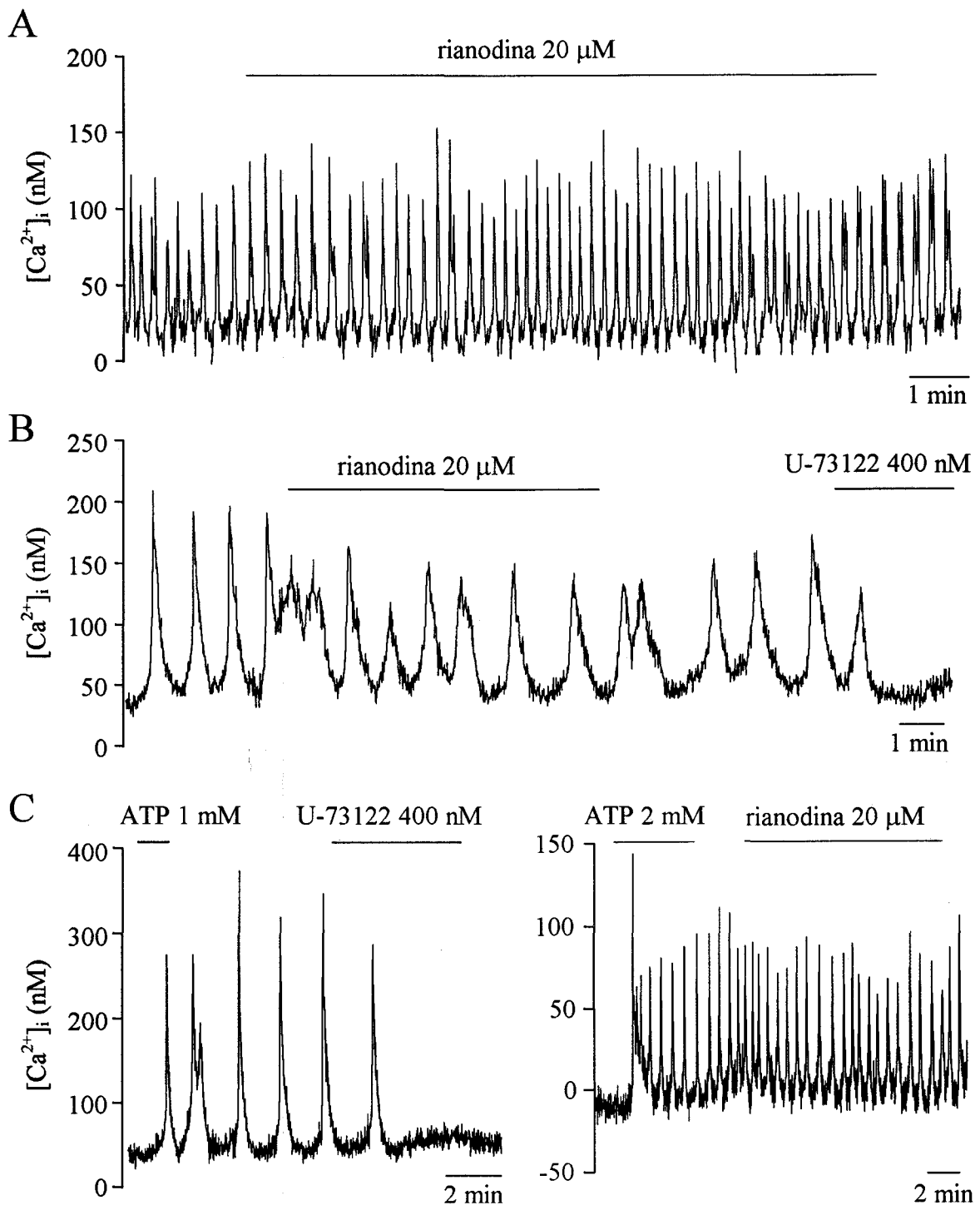


Figura 25. Participación del receptor para $InsP_3$ en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} en los miocitos de conducción. A. Oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en un miocito de conducción que no se afectan por la aplicación de 20 μ M rianodina. B. Ausencia de bloqueo de las oscilaciones de Ca^{2+} por rianodina y su inhibición por el U-73122 (400 nM). C. Inhibición de las oscilaciones generada con ATP (1 mM) por la aplicación del U-73122 (izquierda). Resistencia a rianodina de las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por 2 mM ATP (derecha).

El efecto del U-73122 y la rianodina sobre las oscilaciones de Ca^{2+} generadas por ATP es cualitativamente similar. La figura 25C izquierda, muestra un registro donde el U-73122 bloquea las oscilaciones ($n=3$), mientras que la aplicación de rianodina al menos durante 6 minutos apenas afecta las oscilaciones en 10 de los 11 miocitos estudiados (Fig. 25C derecha), al contrario que ocurre con los miocitos de resistencia (véase Fig. 24C).

En estos miocitos, la aplicación de heparina interna (100 $\mu\text{g/ml}$) determinó que las oscilaciones estuvieron ausentes en las 4 células estudiadas.

Estos resultados sugieren que, contrariamente a lo que ocurre con los miocitos de resistencia, en la mayor parte de los miocitos de conducción el receptor para InsP_3 parece ser el responsable fundamental en la generación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

2.3. Regulación diferencial por el AMPc de las oscilaciones de Ca^{2+} citosólico en los miocitos de conducción y de resistencia

La aplicación de cafeína a concentraciones iguales o superiores a 1 mM inhibió mayoritariamente las oscilaciones de Ca^{2+} en 7 miocitos de conducción de los 8 estudiados. Este efecto podría estar asociado al incremento del AMPc debido a la inhibición de la 5', 3'-fosfodiesterasa (Butcher y Sutherland, 1962) o bien a la modulación negativa del receptor para InsP_3 (Parker y Ivorra, 1991). Para determinar si el efecto de la cafeína estaba mediado por la fosfodiesterasa se utilizó otro inhibidor de esta enzima como la teofilina (Butcher y Sutherland, 1962). La teofilina (1mM) produjo un efecto similar al que se observó con la aplicación de cafeína, bloqueando las oscilaciones en 7 de los 9 miocitos de conducción estudiados. Un ejemplo de la respuesta de los miocitos de conducción a los inhibidores de la fosfodiesterasa se representa en la figura 26. Las aplicaciones de la teofilina y cafeína provocaron en menos de 1 min un bloqueo reversible de las oscilaciones (Fig. 26A), acompañado generalmente de la reducción de la concentración de Ca^{2+} basal. Obsérvese que, como se describió anteriormente, (ver Fig. 25), la rianodina, tras 12 min de aplicación al medio externo, apenas afectó a las oscilaciones, lo que sugiere la participación del receptor para InsP_3 en la generación de estas espigas de Ca^{2+} .

Un efecto sobre las oscilaciones cualitativamente similar al de la teofilina o cafeína se obtuvo por el incremento de AMPc producido tras la activación de la adenilatociclasa por

la forskolina. En este caso también se observó un bloqueo reversible de las oscilaciones de Ca^{2+} en 9 de las 10 células estudiadas (ver Fig. 26B).

Por lo tanto, los experimentos realizados en miocitos de conducción indican que en las oscilaciones registradas en estas células el receptor para InsP_3 participa de una forma fundamental, y que el AMPc inhibe la liberación de Ca^{2+} mediada por este receptor, tal como ha sido descrito previamente sobre la liberación de Ca^{2+} inducida por carbacol en células de músculo liso (Ding y col., 1997; Murthy y col., 1993) y las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por ATP en megacariocitos (Uneyama y col., 1993), mediadas ambas por InsP_3 .

Miocitos de conducción

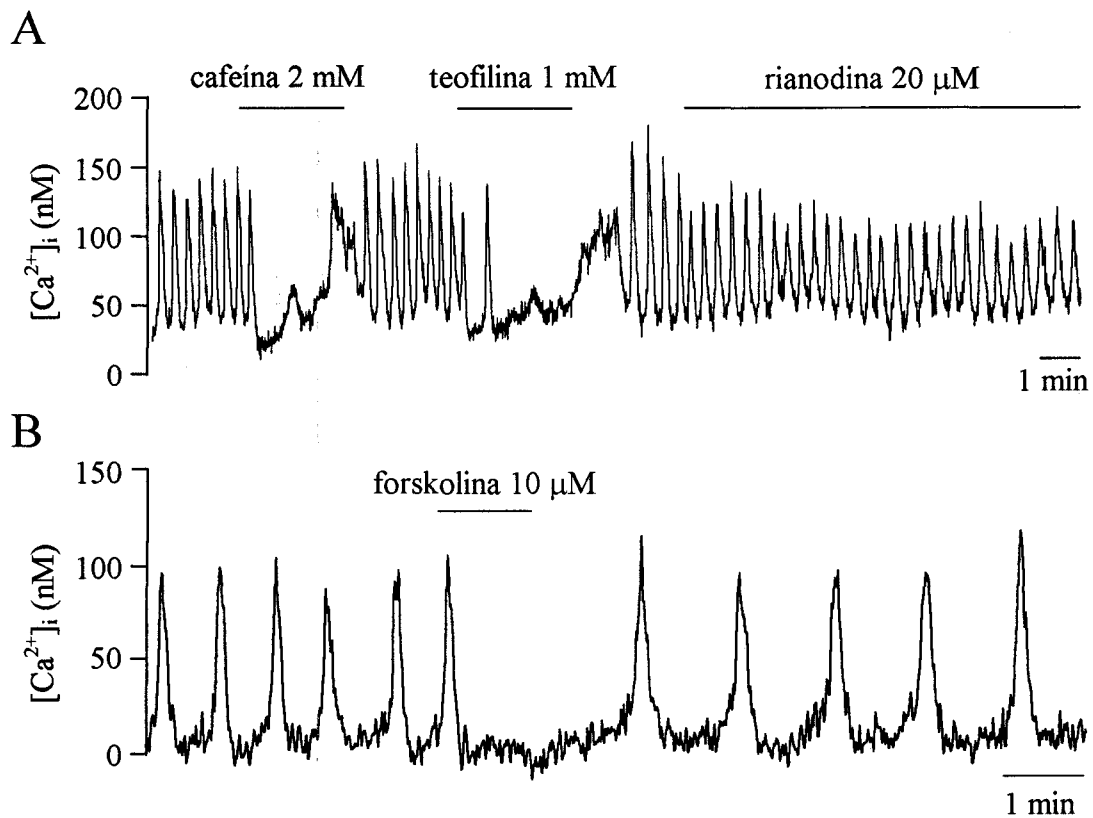


Figura 26. Efecto del incremento del AMPc sobre las oscilaciones en miocitos de conducción. A. Bloqueo de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la aplicación extracelular de 2 mM cafeína y 1 mM teofilina. El bloqueo del receptor para rianodina (20 μM) no interrumpe las oscilaciones. B. Interrupción de las oscilaciones por la inhibición de la adenilatociclasa mediante la forskolina (10 μM).

En miocitos de resistencia la aplicación de 1 mM cafeína no produjo el mismo efecto que en miocitos proximales o de conducción. La cafeína no bloqueó las oscilaciones en 4

miocitos de resistencia de 5 estudiados, sino que dio lugar en algunos casos al aumento de la amplitud como se observa en la figura 27A. Este efecto de la cafeína, parece estar asociado a la acción sobre la fosfodiesterasa, y no a su acción sobre el receptor para rianodina, ya que la aplicación de teofilina, produce un efecto similar en la misma célula (ver Fig. 27A). La teofilina no inhibió las oscilaciones de Ca^{2+} en 4 de las 6 células estudiadas. Obsérvese como las oscilaciones de Ca^{2+} en estas células sí son sensibles a rianodina, ya que se bloquean irreversiblemente (ver Fig. 27A), lo que indica que las espigas de Ca^{2+} , como se mostró anteriormente (ver Fig. 24), se deben a la liberación de Ca^{2+} mediada por el receptor para rianodina.

Miocitos de resistencia

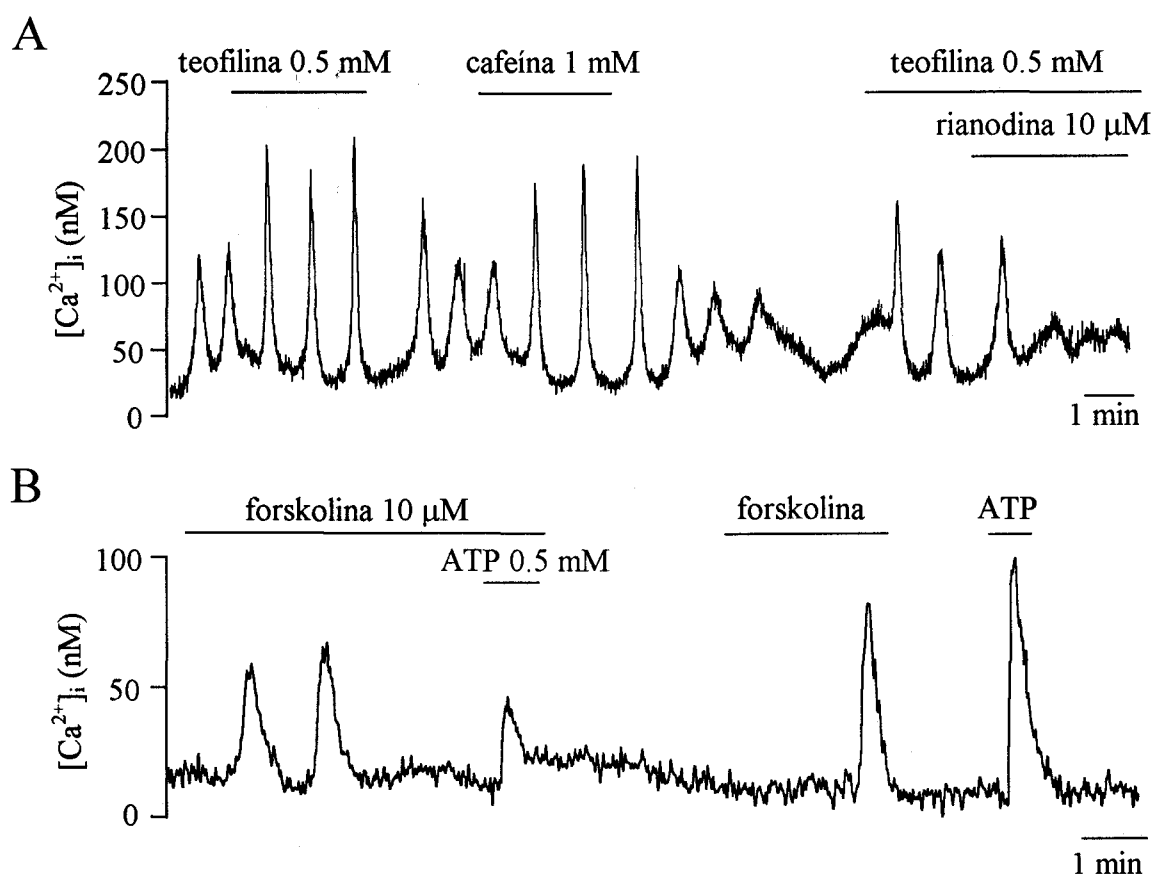


Figura 27. Efecto del incremento del AMPc sobre las oscilaciones de Ca^{2+} en miocitos de resistencia. A. Incremento de la amplitud de las oscilaciones por la inhibición de la fosfodiesterasa mediante cafeína (1 mM) y teofilina (0.5 mM). El bloqueo del receptor para rianodina (10 μM) interrumpe las oscilaciones. B. Liberación de Ca^{2+} en células silentes mediante la inhibición de la adenilatociclase por 10 μM forskolina. La liberación de Ca^{2+} inducida por ATP (0.5 mM) y mediada por el receptor para InsP_3 , se bloquea parcialmente por la forskolina.

La aplicación de forskolina produjo en algunos miocitos de resistencia, una respuesta cualitativamente similar a las de teofilina o cafeína favoreciendo la liberación de Ca^{2+} (Fig. 27B). Obsérvese que en esta figura, la aplicación de ATP, que libera Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico mediado por InsP_3 , produce menor señal cuando se hace en presencia de forskolina, tal vez debido a la acción del AMPc sobre este receptor descrito anteriormente en los miocitos de conducción. Sin embargo, la forskolina apenas produjo efecto sobre la liberación inducida por cafeína en 3 células estudiadas. Un efecto similar al de la forskolina (posiblemente por incremento del AMPc intracelular) ha sido descrito en neuronas, donde el IBMX que inhibe la fosfodiesterasa, induce la liberación de Ca^{2+} de los receptores sensibles a rianodina (Usachev y col., 1995). El efecto del aumento de la amplitud de las espigas de Ca^{2+} por AMPc registrado en algunos miocitos de resistencia, podía estar asociado a la regulación de la actividad del receptor para rianodina por la fosforilación dependiente de AMPc descrito en células beta del páncreas (Islam y col., 1998) y en cerebro (Yoshida y col., 1993).

En conclusión, los resultados de este apartado sugieren que en las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} de los miocitos de resistencia y conducción participan fundamentalmente los receptores para rianodina e InsP_3 respectivamente, y que las oscilaciones mediadas por estos receptores se modulan diferencialmente por el AMPc.

3. El calcio citosólico como regulador de la actividad eléctrica de los miocitos arteriales

La entrada de Ca^{2+} del medio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares regulan la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y por lo tanto la contractilidad de los miocitos. En el músculo liso pulmonar se han descrito canales de K^+ (K_{Ca}), Cl^- (Cl_{Ca}) y catiónicos que se activan por el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Archer y col., 1996; Clapp y col., 1996; Yuan, 1997a; Bae y col., 1999). La activación de estos canales conlleva cambios en el potencial de membrana que, a su vez, regula la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes y en consecuencia la actividad contráctil celular. Por este motivo, se consideró importante estudiar la actividad eléctrica que podía iniciarse con los cambios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bien durante la generación de las oscilaciones espontáneas o por la acción de agentes que modulan la liberación de calcio

de los almacenes intracelulares. Los experimentos se abordaron mediante la técnica de “patch-clamp”, en su modalidad de fijación de potencial o de corriente, para determinar las conductancias que se activan cuando se generan espigas espontáneas de Ca^{2+} o cuando la liberación se provoca con la aplicación de cafeína.

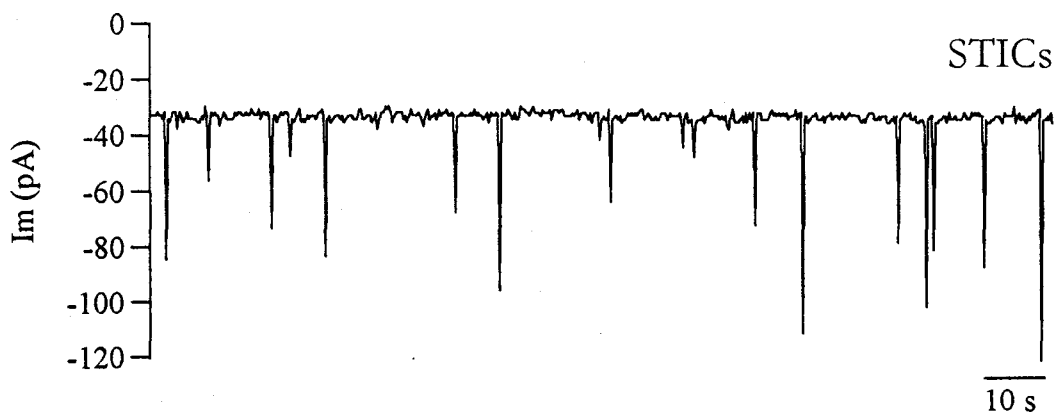
3.1. Relación entre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la actividad eléctrica de la membrana plasmática

En los estudios realizados en miocitos arteriales pulmonares con la técnica de “patch-clamp” se observaron dos clases de corrientes iónicas caracterizadas en un caso por ser corrientes transitorias espontáneas y rápidas, mientras que en otros las corrientes eran más lentas y regulares.

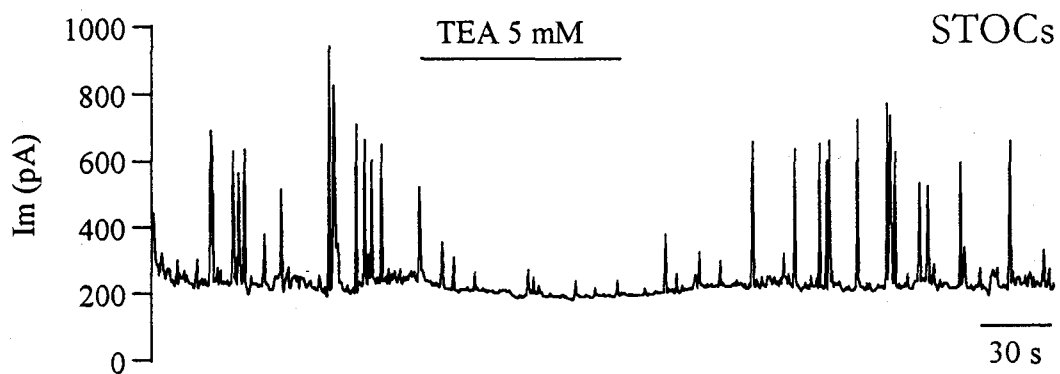
3.1.1. Corrientes espontáneas transitorias salientes (STOCs) o entrantes (STICs) de amplitud y frecuencia irregulares

Los miocitos arteriales pulmonares presentan un tipo de actividad eléctrica espontánea que se caracteriza por corrientes rápidas entrantes o salientes, dependiendo del potencial de membrana, con amplitud y frecuencia irregulares y con características similares a las descritas en miocitos de la arteria de la oreja de conejo (Benham y Bolton, 1986), en músculo liso intestinal (Zholos y col., 1994) y en músculo liso de la arteria pulmonar (Hogg y col., 1993b). En la figura 28 se muestran registros ilustrativos de estos tipos de actividad eléctrica espontánea. En el panel A se representan las corrientes entrantes (STICs) registradas con fijación de voltaje a un potencial de membrana de -70 mV en una célula de músculo liso pulmonar utilizando la solución interna 1 (véase tabla 5). A potenciales más positivos, por ejemplo a 20 mV (Fig. 28B), se registraron corrientes salientes (STOCs) que se bloquearon por TEA, lo que indica la participación de los canales de K_{Ca} descritos por otros autores (Nelson y col., 1995; Mironneau y col., 1996). Obsérvese que en configuración de fijación de corriente (Fig. 28C), en la misma célula se producen hiperpolarizaciones del potencial de membrana supuestamente por la apertura de los canales de K_{Ca} indicados anteriormente.

A Fijación de voltaje, $V_m = -70$ mV



B Fijación de voltaje, $V_m = 20$ mV



C Fijación de corriente

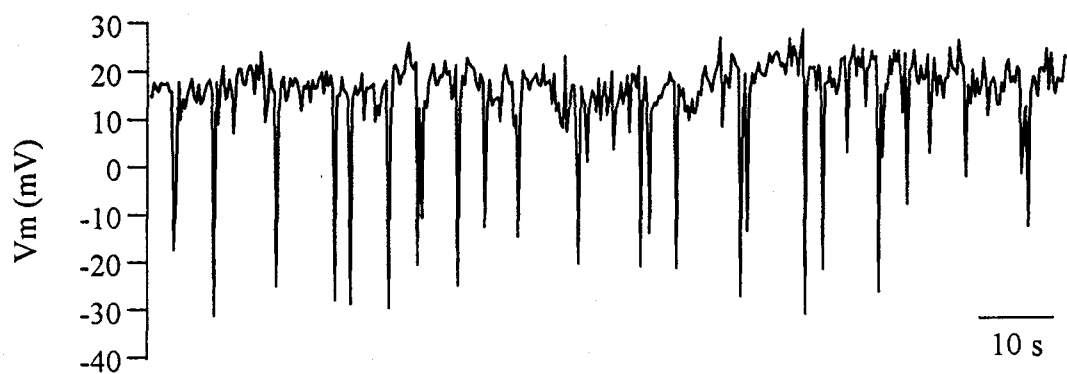


Figura 28. A. Corrientes espontáneas transitorias entrantes “STICs” registradas en miocitos vasculares de pulmón, en configuración de célula completa a un $V_m = -70$ mV. B. Corrientes espontáneas transitorias salientes “STOCs” registradas a un $V_m = 20$ mV. El bloqueo de los canales de K_{Ca} mediante TEA interrumpe reversiblemente estas corrientes. C. Hiperpolarizaciones transitorias registradas en modo de fijación de corriente. Solución interna 1, tabla 5 ($E_{Cl} = -49.3$ mV, $E_K = -99$ mV).

En este trabajo las corrientes rápidas no se han estudiado con detalle porque el objetivo de nuestros experimentos era la medida simultánea de la $[Ca^{2+}]_i$ y la actividad eléctrica, y con la resolución temporal de nuestro sistema, no se pudieron registrar las transiciones de Ca^{2+} que supuestamente activan estas conductancias. Otros autores (Mironneau y col., 1996; Nelson y col., 1995), han medido con suficiente resolución la $[Ca^{2+}]$ citosólico y la actividad eléctrica, observando que la activación de las conductancias que generan los STICs y STOCs se deben a la liberación espontánea de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (“sparks” de Ca^{2+}) mediada por la apertura de una pequeña población de los receptores intracelulares de Ca^{2+} . Se supone que la activación sincrónica de una población amplia de receptores intracelulares provoca una señal de Ca^{2+} global que podría generar las llamadas ondas de Ca^{2+} , que iniciándose en el lugar de los “sparks”, se propagan en el interior de la célula y originan las oscilaciones lentas o espigas de Ca^{2+} estudiadas en este trabajo (Mironneau y col., 1996; Berridge, 1997).

3.1.2. La liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico activa corrientes lentas cuya amplitud y sentido dependen del potencial de membrana

Independientemente de la influencia del potencial de membrana sobre las oscilaciones de Ca^{2+} (véase apartado 1.2), la liberación de Ca^{2+} se acompaña generalmente de corrientes iónicas transmembranales cuya magnitud y sentido depende del potencial de membrana.

La figura 29 muestra un registro simultáneo de oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} y las corrientes a distintos potenciales de membrana. A potenciales de -40 ó -50 mV, las corrientes son entrantes y se convierten en salientes a potenciales más despolarizados.

Aunque generalmente las oscilaciones espontáneas en los miocitos activaron corrientes iónicas, en 26 de los 79 miocitos estudiados, las oscilaciones espontáneas no se acompañaban de actividad eléctrica. En algunos miocitos de conducción (n=4) en los que se registraron oscilaciones espontáneas en la $[Ca^{2+}]_i$ sin actividad eléctrica, la aplicación de cafeína activó corriente transmembranales (ver Fig. 30). La falta de actividad eléctrica durante las oscilaciones espontáneas no fue debida a que la amplitud de la oscilación de Ca^{2+} fuese insuficiente para activar las conductancias, porque la aplicación de cafeína generó una señal de Ca^{2+} de amplitud idéntica a las oscilaciones que activaron la corriente. Este comportamiento podría explicarse si existiera cierta colocalización de los receptores

y los canales iónicos en la membrana plasmática ya que los receptores del retículo sarcoplásmico que activa la cafeína son supuestamente distintos a los que participan en la generación de las oscilaciones espontáneas en los miocitos de conducción.

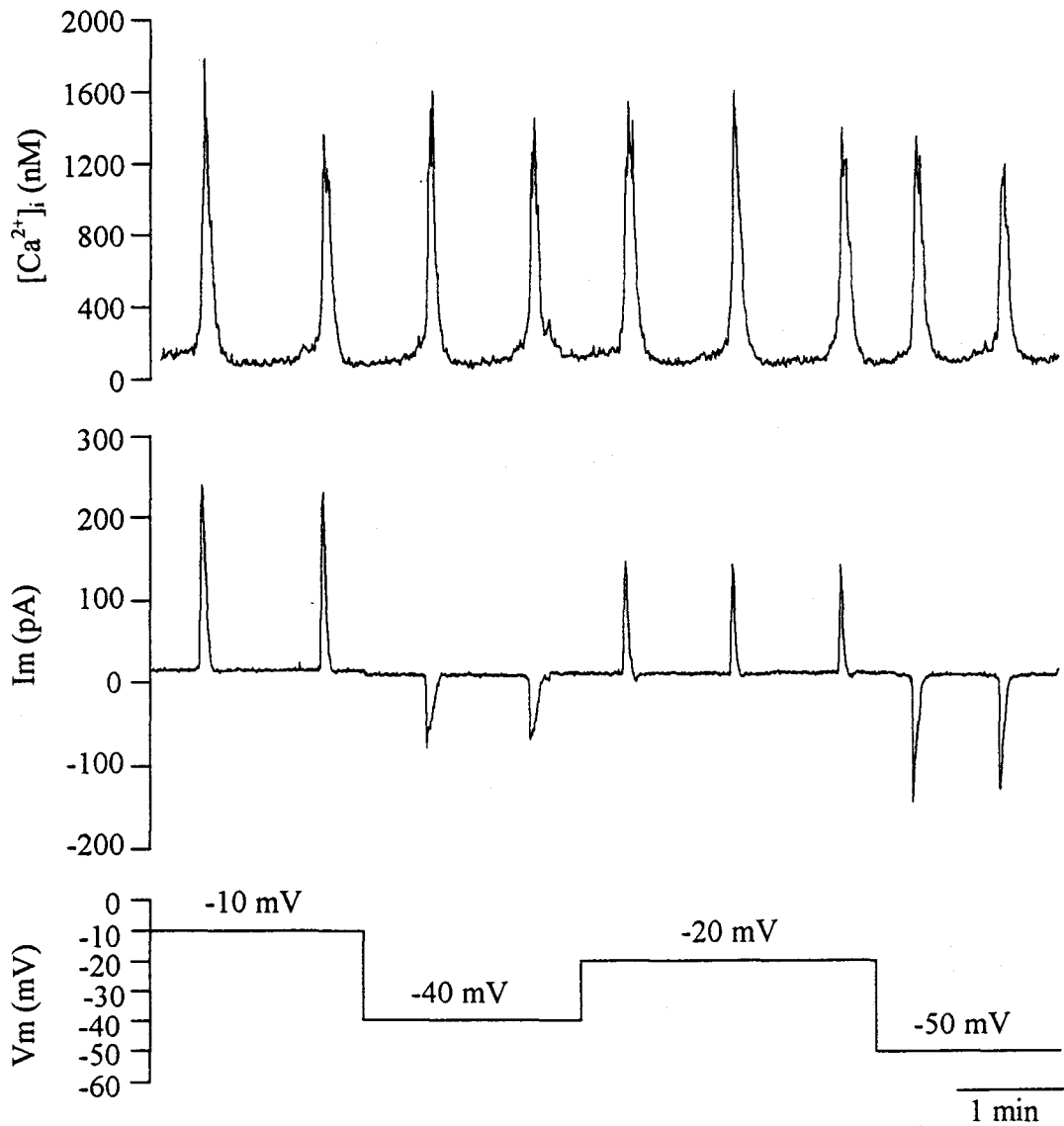


Figura 29. Las oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ activan corrientes lentas cuya amplitud y sentido dependen del potencial de membrana. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV, $E_K = -99$ mV).

De la misma forma que el potencial de membrana regula las corrientes iónicas que acompañan a las oscilaciones espontáneas, también lo hace sobre las corrientes iónicas inducidas por la aplicación extracelular de cafeína.

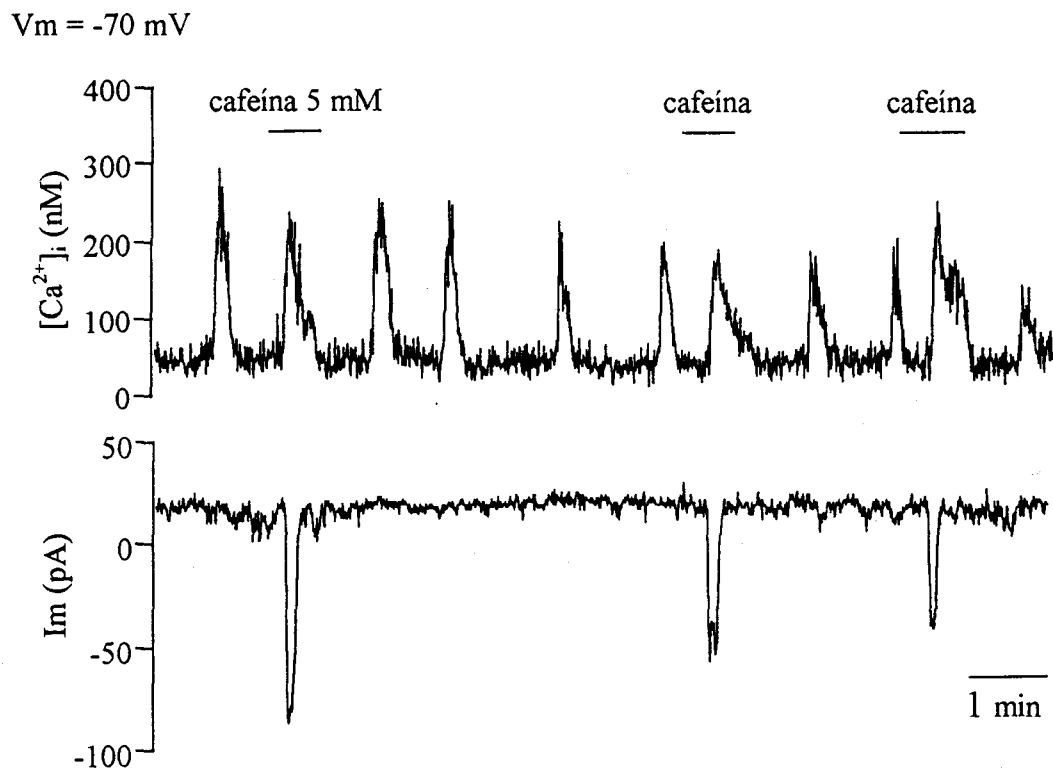


Figura 30. Las oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$ no activan corrientes pero el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ citosólico provocado por la aplicación de 5 mM cafeína genera corrientes entrantes.

En la figura 31 se muestra cómo la amplitud de las señales de Ca^{2+} , registradas en un mismo miocito, apenas se afecta por el potencial de membrana, alcanzando en los tres casos un valor cercano a 550 nM. Sin embargo las corrientes son entrantes a potenciales de membrana inferiores (-70 mV; Fig. 31A) y netamente positivas a -20 mV (Fig. 31C). Cuando $V_m = -40$ mV (Fig. 31B), la corriente presenta una forma de W con tres componentes: un componente saliente entre dos entrantes, lo cual puede indicar la participación de varias conductancias. Obsérvese cómo la corriente no se inicia hasta que la $[Ca^{2+}]_i$ alcanza un determinado valor y cambia de sentido cuando la $[Ca^{2+}]_i$ llega a un valor suficientemente alto en la fase de subida rápida en esta señal. Esto puede ser debido a la participación de los canales de Cl_{Ca} y de K_{Ca} , ya que los primeros son más sensibles a Ca^{2+} que los segundos, necesitándose por lo tanto menor concentración del ión para su activación (Henmi y col., 1996; Carl y col., 1996). La corriente saliente generalmente comienza a decrecer antes de que lo haga el Ca^{2+} lo cual podría deberse a la inactivación que sufren los canales de K_{Ca} (Hicks y Marrion, 1998; Muñoz y col., 1998).

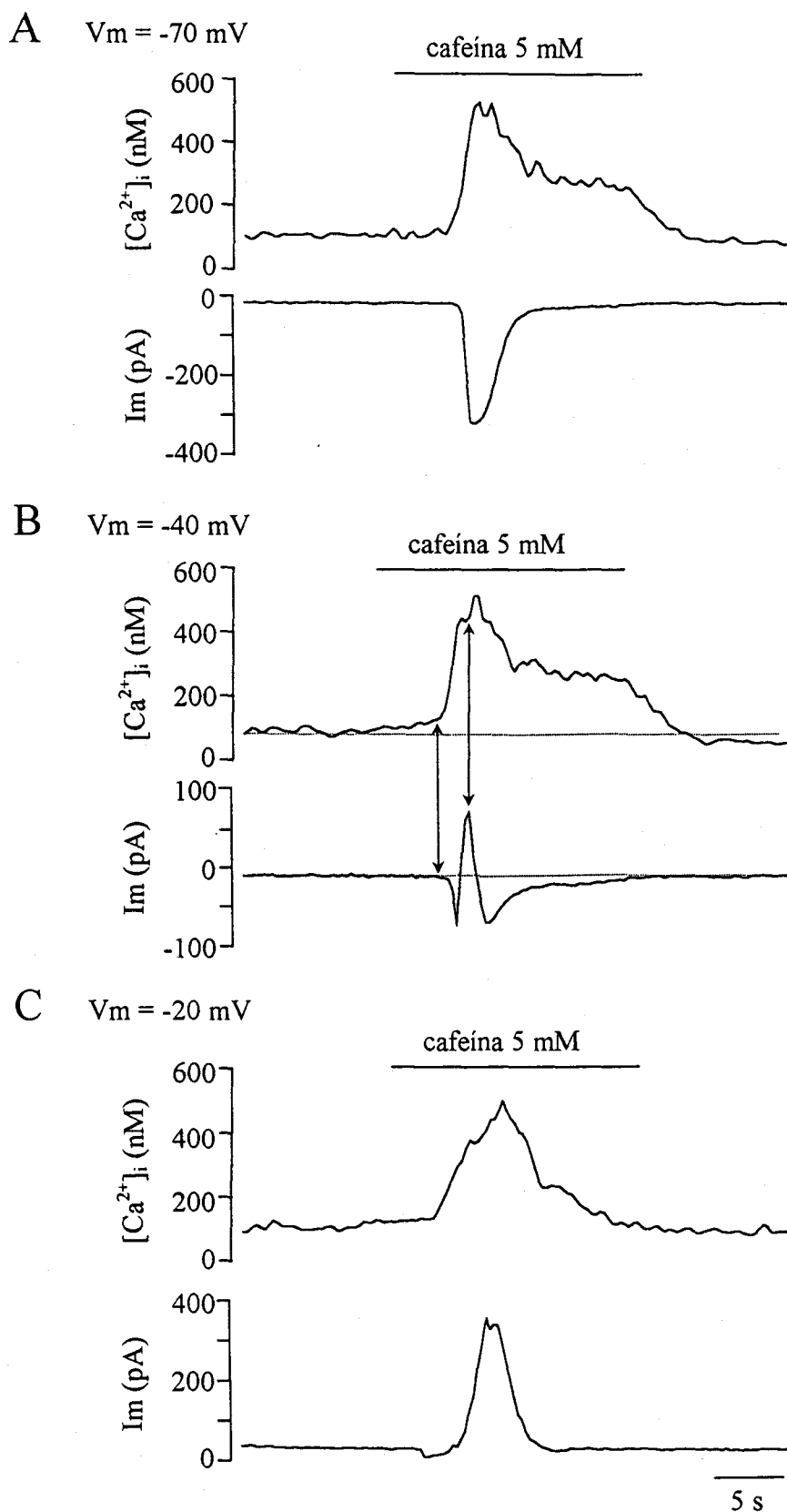


Figura 31. Efecto del potencial de membrana sobre las corrientes que acompañan a la liberación de Ca^{2+} inducida por 5 mM cafeína. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV, $E_K = -99$ mV).

En nuestras condiciones experimentales, tanto las oscilaciones espontáneas como la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína, a determinados V_m , generaron una corriente con tres componentes similares a los de la figura 31B. Esta forma de W en las corrientes ha sido descrita por otros autores en los miocitos vasculares pulmonares donde se registró la actividad eléctrica en respuesta a cafeína y noradrenalina (Hogg y col., 1993a).

3.1.3. Relación temporal entre las oscilaciones de Ca^{2+} y las corrientes iónicas

El estudio detallado de la relación temporal existente entre las señales de Ca^{2+} y las corrientes iónicas, dentro de la resolución temporal de nuestro sistema, muestra generalmente tres fases en la espiga de Ca^{2+} : una primera que corresponde a una ligera subida de Ca^{2+} , otra segunda fase rápida asociada a la liberación masiva de Ca^{2+} al citosol, y finalmente una última fase de recuperación del nivel basal que corresponde fundamentalmente a la recaptación de Ca^{2+} por las bombas de retículo sarcoplásmico (Iino y col., 1993; Berridge y Irvine, 1989). En este tipo de registros se pueden establecer las relaciones temporales entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y las corrientes iónicas que se definen en la figura 32. Obsérvese que entre el inicio de la subida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la generación de la corriente existe un retraso " r_1 ", iniciándose la corriente entrante cuando el Ca^{2+} alcanza un determinado valor. La corriente a su vez alcanza su valor máximo antes del pico en la concentración de Ca^{2+} (retraso r_2). El análisis de los retrasos r_1 y r_2 en miocitos de resistencia y conducción que oscilaban espontáneamente o estimulados con cafeína indica que aunque el valor del retraso r_2 es similar en los dos tipos de miocitos, existen al menos para las oscilaciones espontáneas, diferencias longitudinales en los valores del retraso r_1 (tabla 7).

Dado que las oscilaciones se generan preferentemente por receptores distintos (por el receptor para InsP_3 en los miocitos de conducción y por el receptor para rianodina en los miocitos de resistencia), estos datos refuerzan este argumento y sugieren una localización diferente de los receptores en los dos tipos de miocitos, lo que provocaría un retraso distinto en la activación de los canales iónicos. Obsérvese que los retrasos registrados en los miocitos de conducción y resistencia en respuesta a cafeína no fueron significativamente diferentes.

Vm = -50 mV

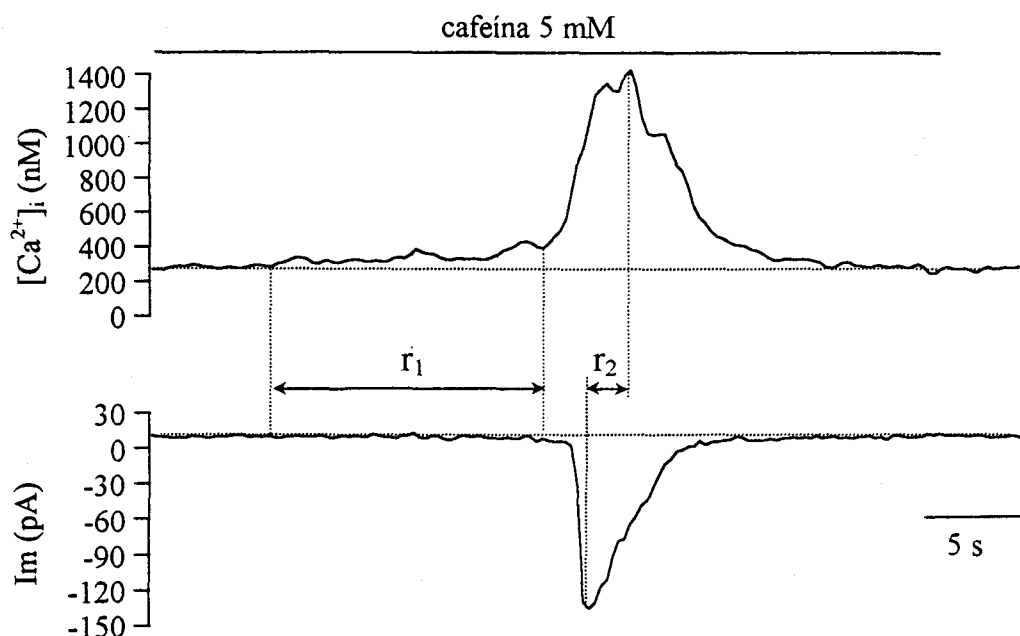


Figura 32. Relación temporal entre la liberación de Ca^{2+} inducida por 5 mM cafeína y la corriente iónica. r_1 : retraso entre el inicio de la corriente y la subida de Ca^{2+} . r_2 : retraso entre los picos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y de la corriente.

Miocitos de conducción			Miocitos de resistencia	
Retrasos	Oscilaciones	Cafeína	Oscilaciones	Cafeína
r_1	$1.14 \pm 0.7 \text{ s}^*$ (n=10)	$4.7 \pm 2.6 \text{ s}$ (n=9)	$3.9 \pm 3.3 \text{ s}$ (n=4)	$3.93 \pm 1.5 \text{ s}$ (n=5)
r_2	$0.9 \pm 0.6 \text{ s}$ (n=8)	$1.95 \pm 1.31 \text{ s}$ (n=8)	$1.02 \pm 0.7 \text{ s}$ (n=5)	$0.92 \pm 0.21 \text{ s}$ (n=5)

Tabla 7. Retrasos entre las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} o inducidas por cafeína y las corrientes iónicas en miocitos de resistencia y conducción. r_1 : retraso entre el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y el inicio de la corriente. r_2 : retraso entre los valores máximos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la corriente. En todos los casos $V_m = -50 \text{ mV}$, los valores se dan como media \pm desviación estándar y “n” representa el número de células. * indica los valores significativamente diferentes (test de la “t” de Student, $p < 0.05$) con respecto a los demás.

3.2. Activación diferencial de los canales de K^+ y Cl^- por el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$

La caracterización de las conductancias iónicas dependientes de la $[Ca^{2+}]_i$ intracelular presentes en la membrana plasmática de los miocitos pulmonares de resistencia y de conducción, se llevó a cabo utilizando bloqueantes de los canales de K_{Ca} , Cl_{Ca} y a partir de los potenciales de reversión determinados con distintas concentraciones iónicas en las soluciones de registro.

3.2.1. Experimentos con bloqueantes selectivos

La contribución de los canales K_{Ca} a la corriente activada por el calcio se estudió aplicando a la solución extracelular tetraetilamonio (TEA), un bloqueante de canales K_{Ca} del árbol vascular (Singer y Walsh, 1986; Archer y col., 1996). En el 80% de las células estudiadas ($n=35$), el TEA produjo un bloqueo reversible de las corrientes salientes activadas por las oscilaciones de Ca^{2+} . La figura 33 muestra dos registros representativos del efecto de TEA a dos potenciales diferentes. En el panel A, la célula se mantuvo a un potencial de membrana (V_m) de -50 mV y la aplicación de cafeína produjo una subida de Ca^{2+} que disparó una corriente saliente con un pequeño componente entrante. La corriente saliente se inhibió reversiblemente con TEA mientras que el componente entrante apenas se afectó. Este hecho indica que además de la corriente saliente de K_{Ca} , existen otras conductancias activadas por Ca^{2+} . En el panel B se muestra el bloqueo casi total y reversible del TEA sobre la corriente en otra célula a un potencial de membrana de -20 mV. Obsérvese que en ambos casos la señal de Ca^{2+} apenas se afecta por la aplicación de TEA, lo que indica que el bloqueante actúa directamente sobre los canales iónicos y no sobre los mecanismos generadores de la señal de Ca^{2+} . El TEA parece por lo tanto bloquear una componente de la corriente mediada por canales K_{Ca} cuya dirección es generalmente saliente debido a que en las condiciones experimentales $E_K = -99$ mV (solución interna 1, tabla 5). Manteniendo las mismas condiciones experimentales ($V_m = -50$ mV y solución interna 1) se compararon las corrientes generadas en miocitos de conducción y de resistencia, y se observó que mientras que en los primeros se registraron corrientes salientes en 14 de 22 células estudiadas, en los segundos las corrientes salientes

aparecieron sólo en 2 de 11 células. Estos datos indican que en los miocitos de conducción los canales de K_{Ca} participan más en la respuesta al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ que en los miocitos de resistencia.

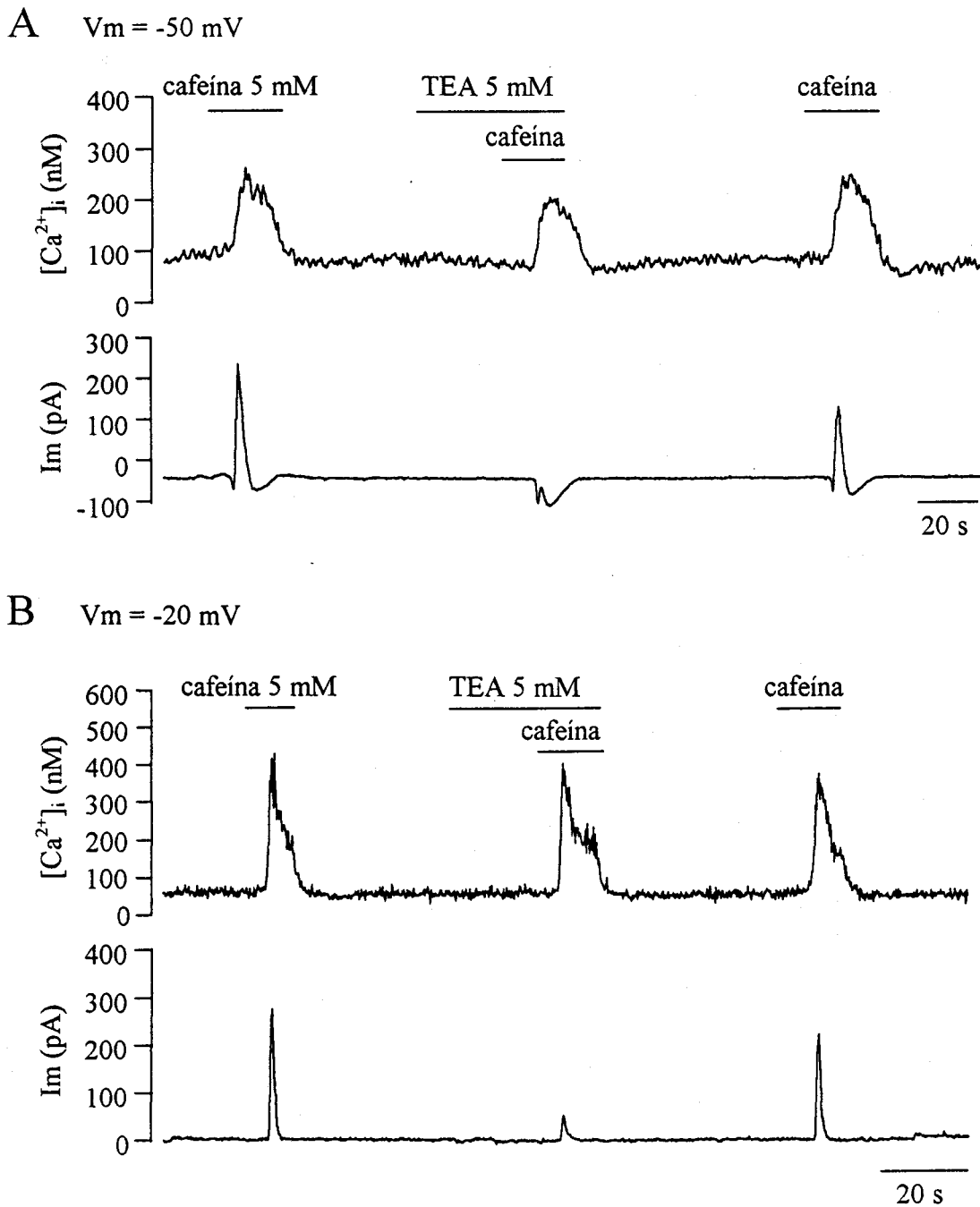
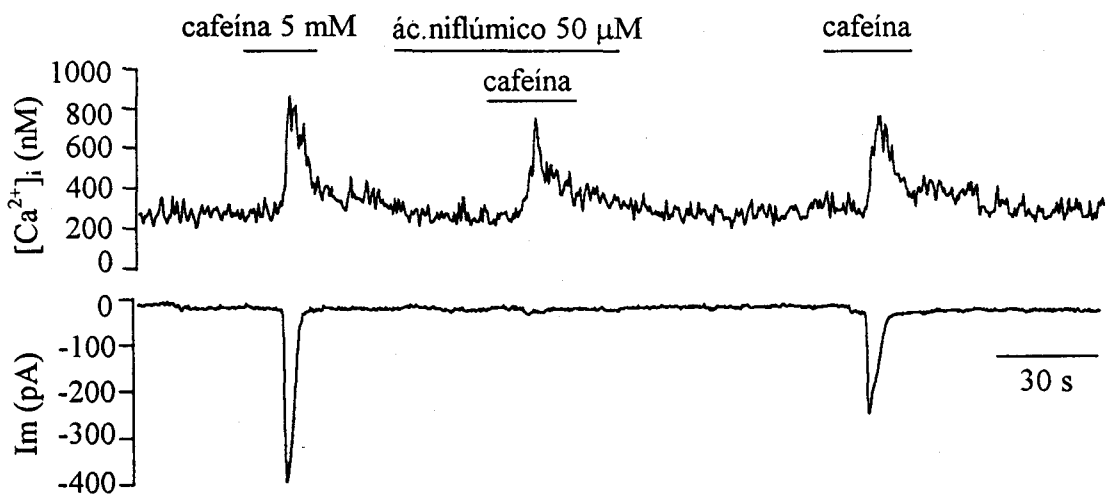


Figura 33. Identificación de los canales de K_{Ca} mediante bloqueantes. El TEA (5 mM) bloquea la corriente saliente activada por la liberación de Ca^{2+} inducida por 5 mM cafeína a -50 mV (A) y a -20 mV (B). Solución interna 1, tabla 5 ($E_{Cl} = -49.3$ mV y $E_K = -99$ mV).

Para estudiar la contribución de los canales de cloro a la corriente total activada por Ca^{2+} (Cl_{Ca}) se utilizó como bloqueante selectivo de estos canales el ácido niflúmico a concentración entre 10-50 μM . Se evitó el uso de concentraciones mayores ya que este agente puede activar los canales K_{Ca} y enmascarar los resultados (Hogg y col., 1994; Clark y col., 1998).

A $V_m = -70 \text{ mV}$



B $V_m = -10 \text{ mV}$

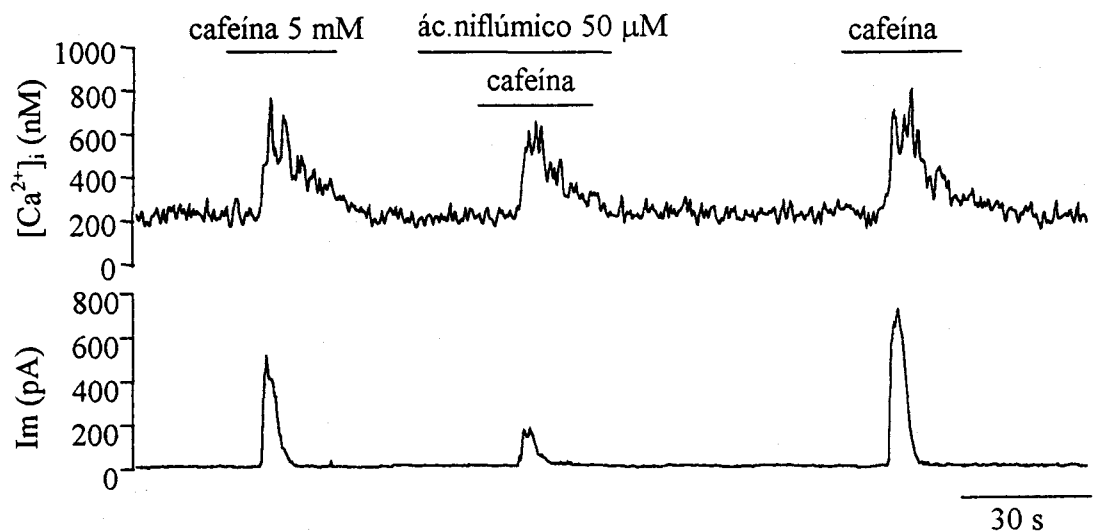


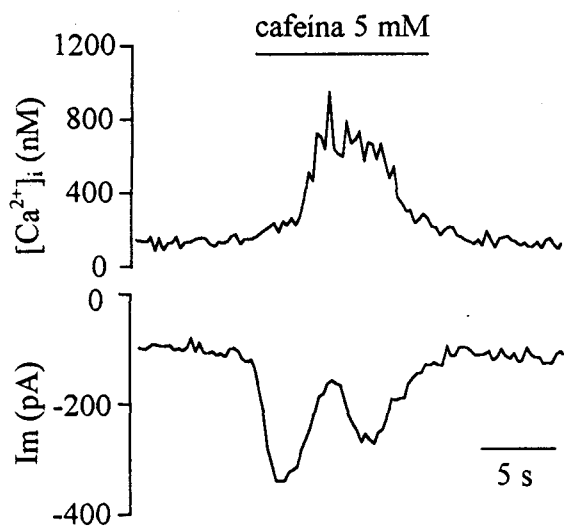
Figura 34. Identificación de los canales de Cl_{Ca} mediante bloqueantes. El ácido niflúmico (50 μM) bloquea reversiblemente la corriente entrante a -70 mV (A) y la corriente saliente a -10 mV (B) inducidas por la liberación de Ca^{2+} . Solución interna 2, tabla 5 ($E_{\text{Cl}} = -31 \text{ mV}$, $E_{\text{K}} = -99 \text{ mV}$).

En la figura 34 se ilustra la inhibición de la corriente por ácido niflúmico a dos potenciales de membrana usando la solución interna 2 con la que E_{Cl} es -31 mV (tabla 5). En el panel A se muestra el registro de una célula expuesta a cafeína donde la subida de Ca^{2+} generó una salida de Cl^- hacia el exterior. Esta respuesta se bloquea casi completamente por la aplicación de ácido niflúmico, lo que sugiere que la corriente estaba mediada por canales de Cl_{Ca} . Cuando la célula se despolarizó a -10 mV, (V_m superior a E_{Cl}) se generó una corriente saliente también bloqueada reversiblemente por el ácido niflúmico (Fig. 34B). Utilizando la solución interna 2 (tabla 5) y a un potencial de membrana igual a -70 mV, el ácido niflúmico produjo un bloqueo de las corrientes activadas por el Ca^{2+} en 4 de los 5 miocitos de resistencia estudiados, mientras que este efecto sólo se observó en 1 de 5 miocitos de conducción. Estos datos sugieren que existe una distribución diferencial de canales de cloro sensibles a Ca^{2+} (Cl_{Ca}) a lo largo del árbol arterial pulmonar.

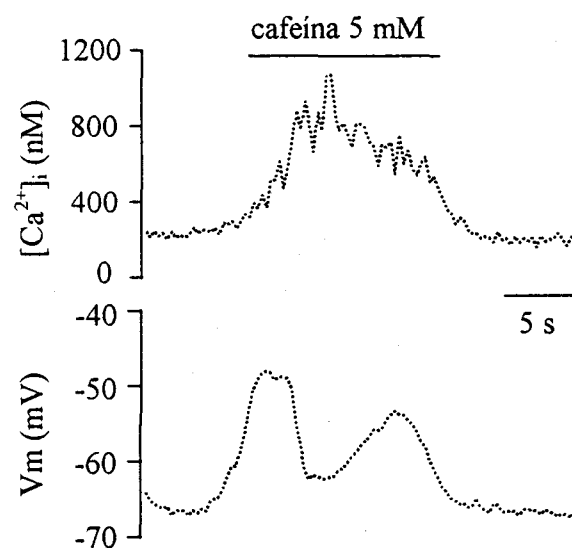
3.2.2. Experimentos de fijación de voltaje y de corriente con sustitución iónica

Con objeto de determinar si los cambios en el potencial de membrana obtenidos con la técnica de fijación de corriente se corresponden adecuadamente con las corrientes iónicas registradas con fijación de voltaje, se midieron y compararon en una misma célula las corrientes iónicas y el potencial de membrana reguladas por la $[Ca^{2+}]_i$. En la figura 35A se muestra un registro representativo de la corriente en W (ver “apartado 3.1.2”) generada tras la exposición a cafeína de una célula en configuración de fijación de voltaje ($V_m = -70$ mV). Cuando se repite la aplicación de cafeína en la misma célula en configuración de fijación de corriente y manteniendo V_m cercano a -70 mV (Fig. 35B), se produce un cambio del potencial de membrana que es imagen especular del flujo de corriente iónica. En la figura 35C se superponen las dos respuestas y se muestran sus fases y relaciones con la concentración de calcio (ver también Fig. 31B). Nótese como la corriente saliente y la hiperpolarización (fase 2) se activa con concentraciones de Ca^{2+} superiores a la necesaria para activar la corriente entrante y la despolarización (fases 1 y 3).

A Fijación de voltaje
 $V_m = -70$ mV



B Fijación de corriente



C

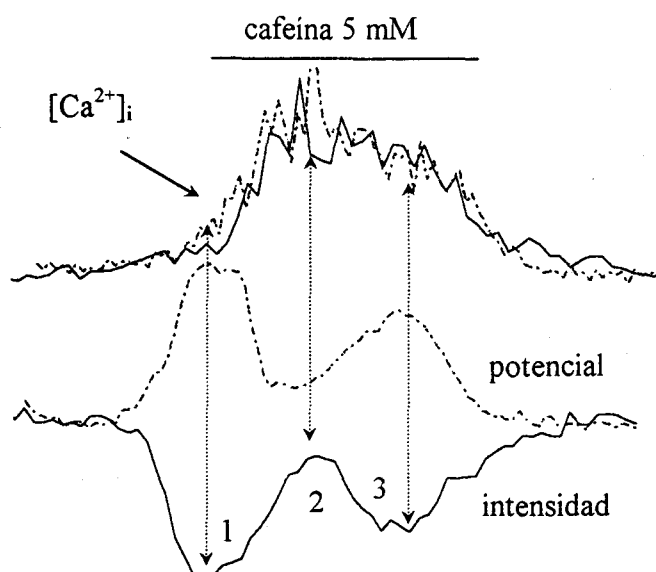
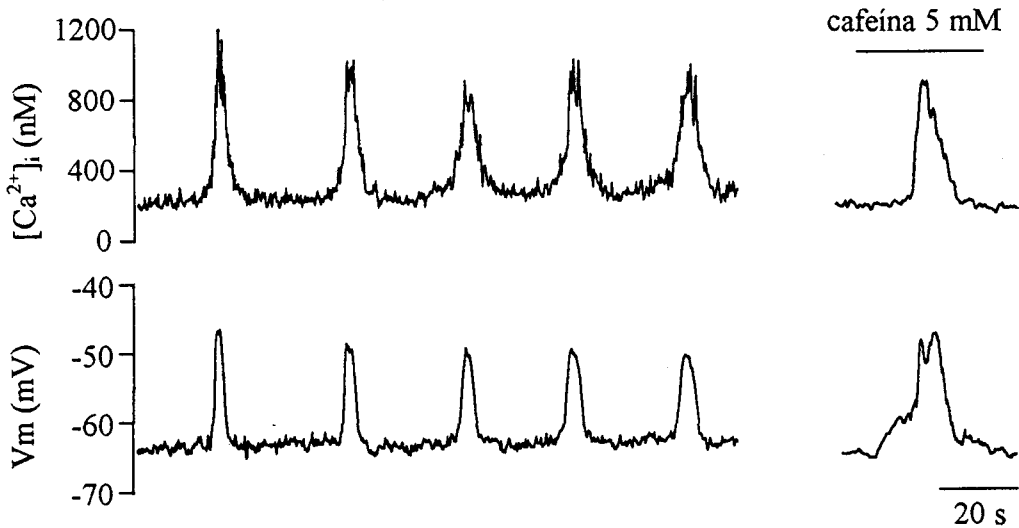


Figura 35. Comparación de la corriente iónica y el potencial de membrana registrados en una misma célula. A. Registros obtenidos en fijación de voltaje a -70 mV. B. Registros obtenidos en fijación de corriente. C. Superposición, tras su escalado, de las señales de Ca^{2+} , intensidad y potencial de membrana de los registros A y B. Los números representan las diferentes fases de la intensidad y potencial (ver texto para más detalles). Solución interna 2, tabla 5 ($E_{\text{Cl}} = -31$ mV, $E_{\text{K}} = -99$ mV).

Las relaciones entre el potencial de membrana y el flujo de corriente descritas en el párrafo anterior fueron similares cuando se compararon registros en la configuración de fijación de voltaje y de corriente durante la génesis de oscilaciones espontáneas de la

$[Ca^{2+}]_i$. En la figura 36 se compara el efecto de la liberación de Ca^{2+} espontánea o inducida por cafeína sobre el potencial de membrana, en células que se encontraban a un potencial de membrana hiperpolarizado (panel A) y a un potencial de membrana despolarizado (panel B). Nótese que en las dos situaciones la subida de Ca^{2+} producida por la cafeína y las oscilaciones espontáneas producen un efecto similar; despolarización cuando la célula está hiperpolarizada (panel A) e hiperpolarización en el caso contrario (panel B).

A



B

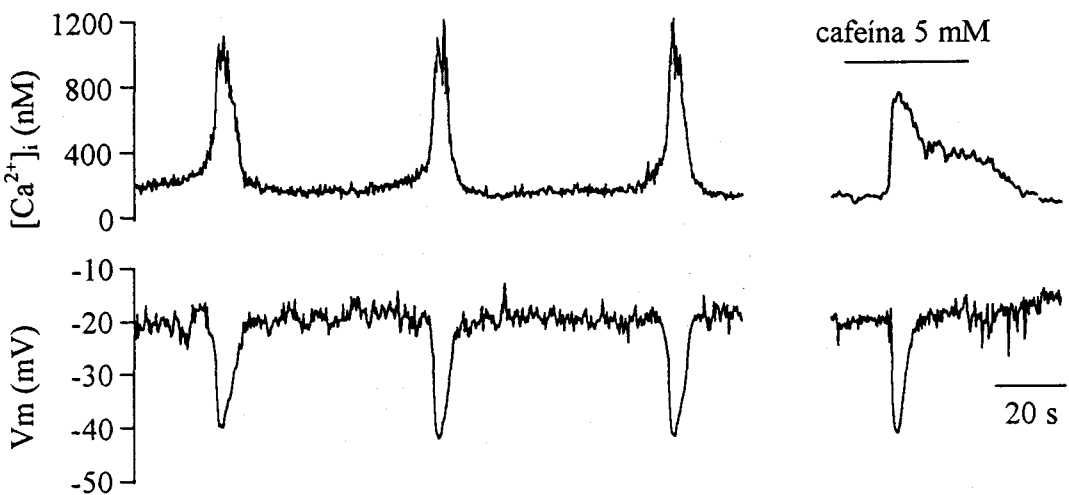


Figura 36. Comparación de los efectos de la liberación espontánea de Ca^{2+} o inducida por cafeína (5 mM) sobre el potencial de membrana. A. Los incrementos de Ca^{2+} originados por oscilaciones espontáneas o aplicación de cafeína producen idénticas despolarizaciones. B. Los incrementos de Ca^{2+} inducen hiperpolarizaciones a potenciales de membrana despolarizantes. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV, $E_K = -99$ mV).

En los experimentos realizados mediante sustitución iónica en miocitos de conducción y de resistencia, se determinó el potencial de reversión utilizando diferentes soluciones internas (véase la tabla 5).

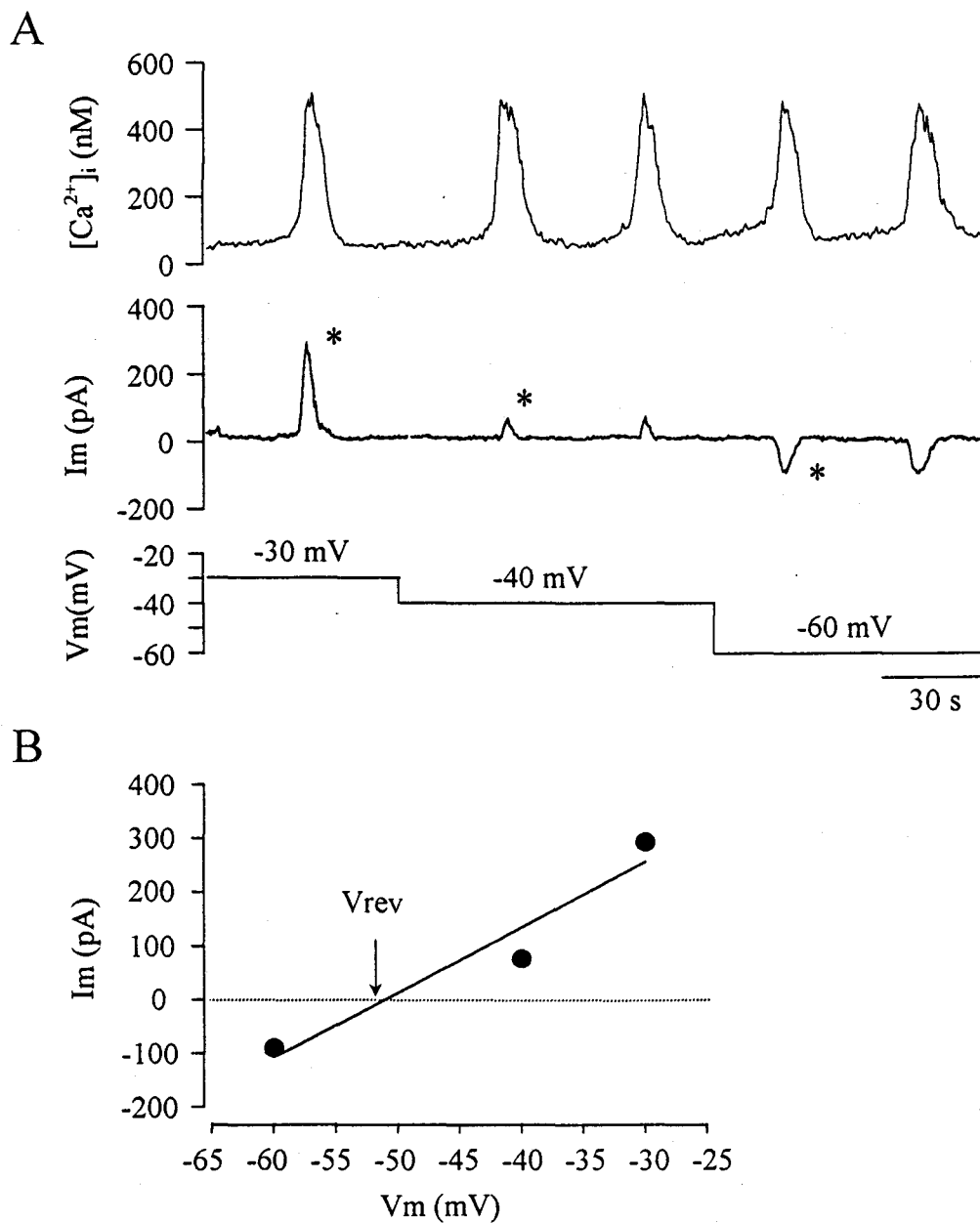


Figura 37. Método empleado para la determinación del potencial de reversión. A. Activación de corrientes iónicas de amplitud y sentido dependientes del potencial de membrana por las oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$. B. Ajuste lineal de las corrientes señaladas con asterisco en el panel A. El punto de corte del ajuste con la línea de 0 pA determina el potencial de reversión ($V_{rev} \approx -51.5$ mV). Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV y $E_K = -99$ mV).

El potencial de reversión se obtuvo mediante el punto de corte, con la línea de corriente cero, de la curva I/V (corriente/voltaje) obtenida con el ajuste lineal de los picos de corriente para los que cambia el sentido de la misma. Dado que la amplitud de la corriente es función de la $[Ca^{2+}]_i$; la determinación del potencial de reversión se realizó considerando únicamente los picos de corrientes para los cuales la $[Ca^{2+}]_i$ era similar.

En la figura 37A se muestra un registro de oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en un miocito en el que se determinó el potencial de reversión de las corrientes iónicas indicadas con asterisco. Estas corrientes y potencial de membrana se utilizan para hacer el ajuste lineal mostrado en la figura 37B. El potencial de reversión (V_{rev}) está indicado por una flecha que representa el punto de corte del ajuste con la línea de intensidad nula.

3.2.2.1. Experimentos de fijación de potencial y de corriente realizados con la solución interna 2 ($[Cl^-]_i = 43$ mM; $E_{Cl} = -31$ mV; $E_K = -99$ mV)

Los experimentos iniciales diseñados para determinar el potencial de reversión de las corrientes activadas por la $[Ca^{2+}]$ citosólico se realizaron dializando las células con la solución interna 2 (tabla 5). Con esta solución (y con la solución externa 1; tabla 4) el potencial de equilibrio para el cloro (E_{Cl}) es -31 mV, cercano al potencial de equilibrio para este ión en condiciones fisiológicas (Large y Wang, 1996; Nelson y col., 1997).

En la mayoría de los miocitos de resistencia (4 de 6 células estudiadas), el potencial de reversión promedio de las corrientes fue de -29.3 ± 1.5 mV (ver tabla 8), cercano al E_{Cl} , lo que sugiere una participación importante de los canales de cloro regulados por el Ca^{2+} en los cambios de potencial inducidos por la cafeína o las oscilaciones de Ca^{2+} en estas células. En la figura 38 se representan trazados típicos de los incrementos de Ca^{2+} y las corrientes iónicas registradas tras el estímulo con cafeína en un miocito aislado de las ramas distales de la arteria pulmonar. Cuando el potencial de membrana es de -30 mV, cercano al E_{Cl} , apenas se aprecia corriente, mientras que a potenciales inferiores o superiores, las corrientes son entrantes o salientes respectivamente, regulándose su amplitud por el potencial de membrana. En la tabla 8 se muestran los valores promedio de los potenciales de reversión obtenidos para los dos tipos de miocitos en diferentes condiciones experimentales.

Miocitos de resistencia, $E_{Cl} = -31$ mV (fijación de voltaje)

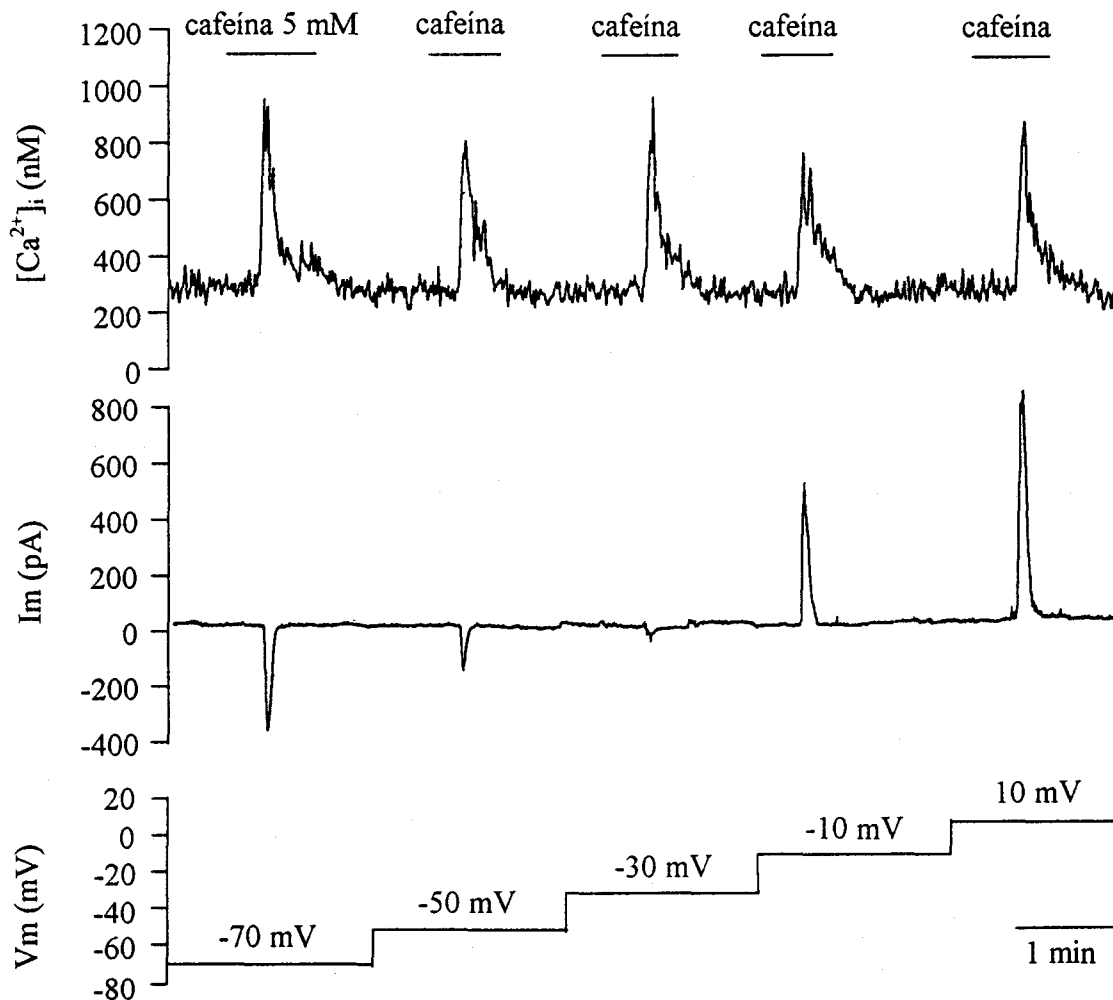


Figura 38. Corrientes iónicas activadas por la liberación de Ca^{2+} inducida por 5 mM cafeína registradas a diferentes potenciales de membrana. En este caso el potencial de reversión está próximo a -30 mV. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV y $E_K = -99$ mV).

Cuando los experimentos se realizaron con la modalidad de fijación de corriente, se obtuvieron resultados similares a los descritos en el párrafo anterior. La figura 39 muestra un registro de un miocito de resistencia con un potencial de membrana de -75 mV, donde la aplicación de cafeína produjo una despolarización hasta un valor cercano al E_{Cl} , representado en la figura por la línea discontinua. Cuando la célula se despolarizó hasta un

potencial de 0 mV mediante la inyección de corriente (i.c. en la figura), la aplicación de cafeína produjo una repolarización parcial, de nuevo hasta que el potencial de membrana alcanzó un valor cercano al E_{Cl} .

Miocitos de resistencia, $E_{Cl} = -31$ mV (fijación de corriente)

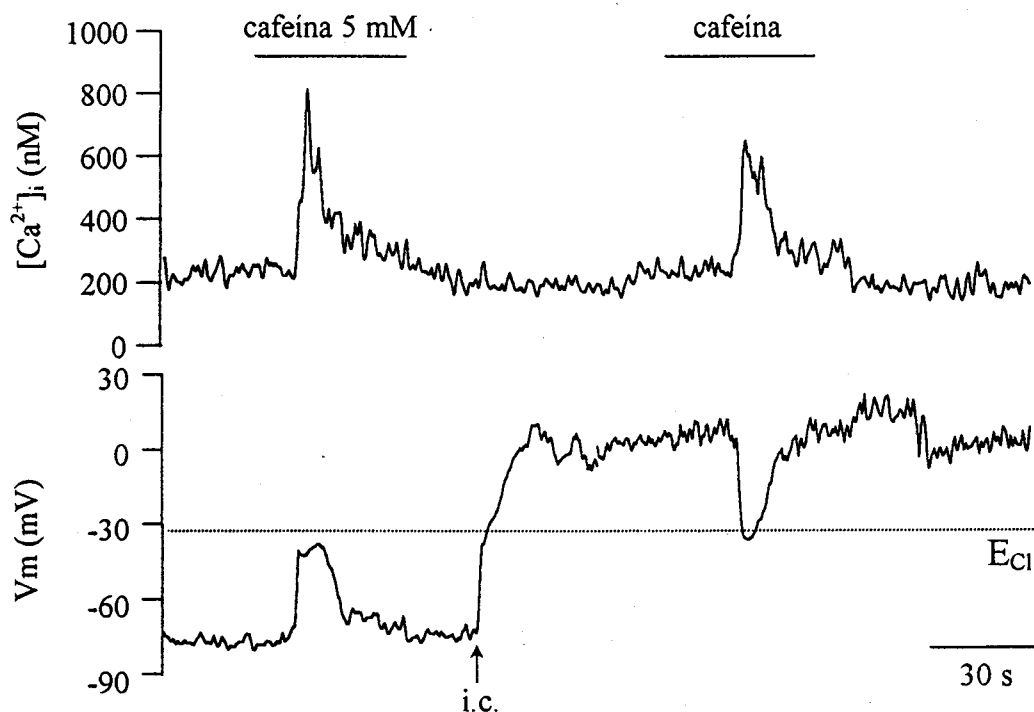


Figura 39. Cambios en el potencial de membrana producidos por la liberación de Ca^{2+} provocada por cafeína. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ desplaza el potencial de membrana hacia el E_{Cl} señalado con la línea discontinua. "i.c." representa el instante en el que se inyecta la corriente. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV y $E_K = -99$ mV).

Estos datos muestran que en la mayoría de los miocitos de resistencia la liberación de Ca^{2+} activa fundamentalmente los canales de Cl_{Ca} , que son los que participan en la regulación del potencial de membrana en respuesta a un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. Los datos obtenidos midiendo las variaciones del potencial de membrana concuerdan con el valor estimado para la reversión de las corrientes mostrados en la tabla 8, donde se indica que el potencial de reversión de la mayor parte de los miocitos de resistencia tiene un valor cercano al E_{Cl} .

La mayoría de los miocitos de conducción (8 de 10 células estudiadas) mostraron características diferentes a las indicadas anteriormente para los miocitos de resistencia, con un valor medio del potencial de reversión de -47.7 ± 10.2 mV, claramente más negativo que el E_{Cl} (véase la tabla 8). En la figura 40 se muestra un registro ilustrativo del comportamiento más frecuente de los miocitos aislados de la arteria de conducción, obtenido con las mismas condiciones experimentales anteriores.

Miocitos de conducción, $E_{Cl} = -31$ mV (fijación de voltaje)

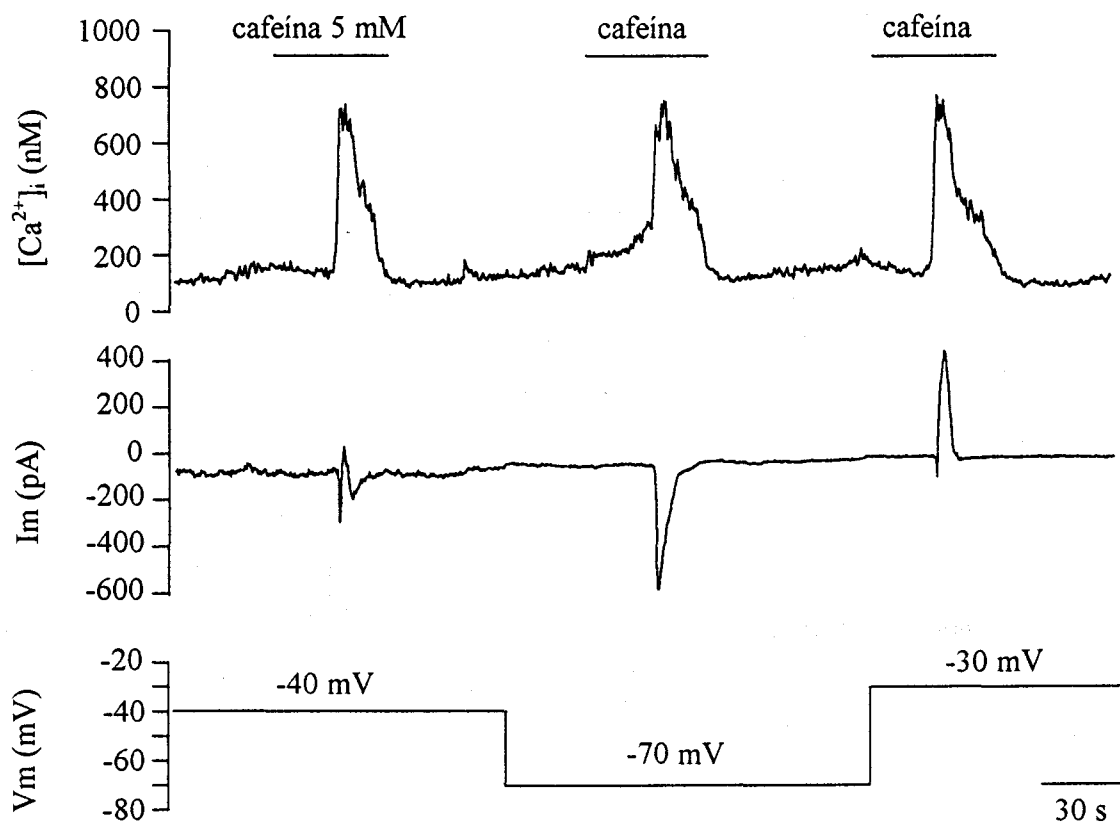


Figura 40. Corrientes iónicas generadas por la liberación de Ca^{2+} inducida por 5 mM cafeína registrada a distintos potenciales de membrana. En este caso el potencial de reversión está próximo a -40 mV. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV y $E_K = -99$ mV).

En este caso, la corriente registrada tiene una forma de W cuando $V_m = -40$ mV, debido a que este potencial es cercano al potencial de reversión de la corriente en esta

célula. La aplicación de cafeína a -30 mV (potencial más positivo que el de reversión) induce una corriente fundamentalmente saliente, mientras que a potenciales inferiores (-70 mV) la corriente es entrante. Recuérdese que el potencial de -30 mV es cercano al de reversión de la corriente en los miocitos de resistencia (ver Fig. 38).

Miocitos de conducción, $E_{Cl} = -31$ mV (fijación de corriente)

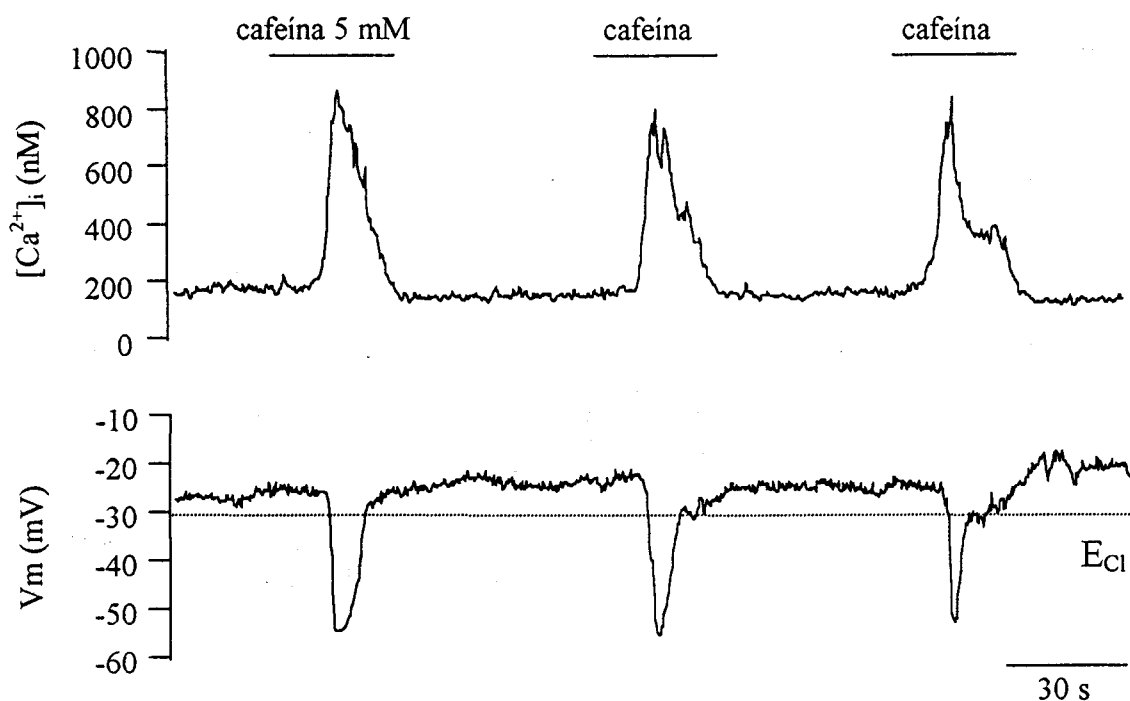


Figura 41. Cambios en el potencial de membrana producido por la liberación de Ca^{2+} inducida por 5mM cafeína. La liberación de Ca^{2+} desplaza el potencial de membrana hacia potenciales más negativos que el E_{Cl} representado por una línea discontinua. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV y $E_K = -99$ mV).

Cuando los experimentos se realizaron en la modalidad de fijación de corriente, se observó que en 7 de 10 células estudiadas el incremento de Ca^{2+} indujo hiperpolarización hacia valores más negativos que el E_{Cl} . Como se refleja en la figura 41, las repetidas aplicaciones de cafeína produjeron un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ similar a las registradas en los miocitos de resistencia (ver Fig. 39), pero que causaron la hiperpolarización hasta -55 mV, potencial netamente más negativo que el E_{Cl} (representado en la figura por la línea

discontinua). Parece, por lo tanto, que en los miocitos de conducción los canales de K_{Ca} tienen una participación mayor que en los miocitos de resistencia y su activación tiende a desplazar el potencial de membrana hacia valores más negativos, cercanos al E_K de -99 mV.

Los resultados obtenidos tanto en los miocitos de conducción como en los de resistencia no se deben a una diferencia en la amplitud de la señal de Ca^{2+} que origina la activación de las conductancias, ya que las amplitudes de las mismas en estas mismas condiciones experimentales fueron de 1056 ± 245 nM (n=4) y de 1274 ± 753 nM (n=7) respectivamente, valores que no son significativamente diferentes.

Soluciones internas	Potencial de reversión	
	miocitos de conducción	miocitos de resistencia
2 ($E_{Cl}=-31$ mV, $E_K=-99$ mV)	-47.7 ± 10.2 (n=8)	-56.5 ± 9 (n=2)
	-31 (n=2)	-29.3 ± 1.5 (n=4)
3 ($E_{Cl}=-3.2$ mV, $E_K=-99$ mV)	-28.5 ± 14 (n=9)	-
	-3.5 (n=1)	-6.6 ± 2 (n=6)
4 ($E_{Cl}=-3.2$ mV, $[K^+]_i=0$ mM)	-4.15 ± 2.7 (n=4)	-1.17 ± 1.3 (n=5)

Tabla 8. Valores promedios de los potenciales de reversión obtenidos con distintas soluciones internas (ver la tabla 5). Los valores, expresados en mV, se presentan como media \pm desviación estándar y "n" representa el número de células estudiadas.

3.2.2.2. Experimentos de fijación de voltaje realizados con la solución interna 3 ($[Cl^-]_i=130$ mM; $E_{Cl} = -3.2$ mV; $E_K = -99$ mV)

Los experimentos que se describen a continuación se realizaron dializando las células con la solución interna 3 (tabla 5), en la que se incrementó la concentración intracelular de cloro y se mantuvo la misma concentración de potasio como en la solución interna 2. Con la solución interna 3, y manteniendo la solución externa 1 (tabla 4), el potencial de equilibrio para el cloro es de -3.2 mV.

En estas condiciones experimentales, los miocitos de resistencia mostraron un

potencial promedio de reversión de -6.6 ± 2 mV ($n=6$), un valor próximo al E_{Cl} (véase tabla 8). En la figura 42 se muestra un registro obtenido en un miocito de resistencia donde el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ tras la aplicación de cafeína apenas genera corriente a -3.2 mV, mientras que a -30 mV la corriente generada es entrante y a $+20$ mV la corriente es saliente, lo que sugiere, que el potencial de reversión está muy cercano al E_{Cl} . Estos datos concuerdan con los obtenidos en los miocitos de resistencia con las condiciones experimentales del apartado anterior.

Miocitos de resistencia, $E_{Cl} = -3.2$ mV (fijación de voltaje)

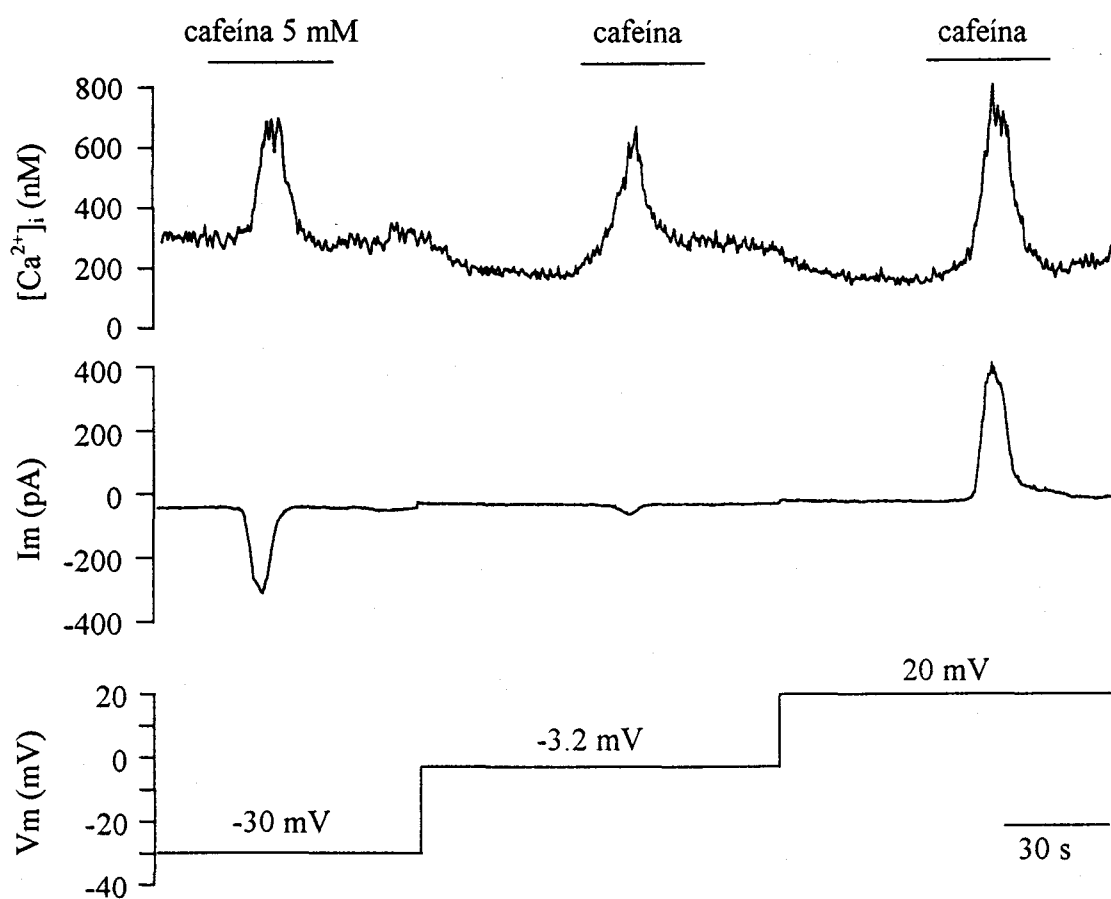


Figura 42. Corrientes iónicas generadas por el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por 5 mM cafeína y registradas a distintos potenciales de membrana. El potencial de reversión es próximo a E_{Cl} . Solución interna 3, tabla 5 ($E_{Cl} = -3.2$ mV y $E_K = -99$ mV).

En el caso de los miocitos de conducción, la mayoría de las células (9 de 10 células estudiadas) mostraron unas características diferentes que las de los miocitos de resistencia con un valor medio de potencial de reversión de -28.5 ± 14 mV ($n=9$), más negativo que el E_{Cl} (véase la tabla 8). En la figura 43 se representa un registro típico de espigas de Ca^{2+} y corrientes de un miocito de conducción. Obsérvese como a un V_m igual a -3.2 mV, la espiga de Ca^{2+} genera una corriente saliente de gran amplitud que persiste aún cuando el potencial de membrana se lleva hasta -20 mV. La corriente entrante se registró a un V_m bastante negativo (-50 mV) respecto al potencial de equilibrio para el Cl^- .

Miocitos de conducción, $E_{Cl} = -3.2$ mV (fijación de voltaje)

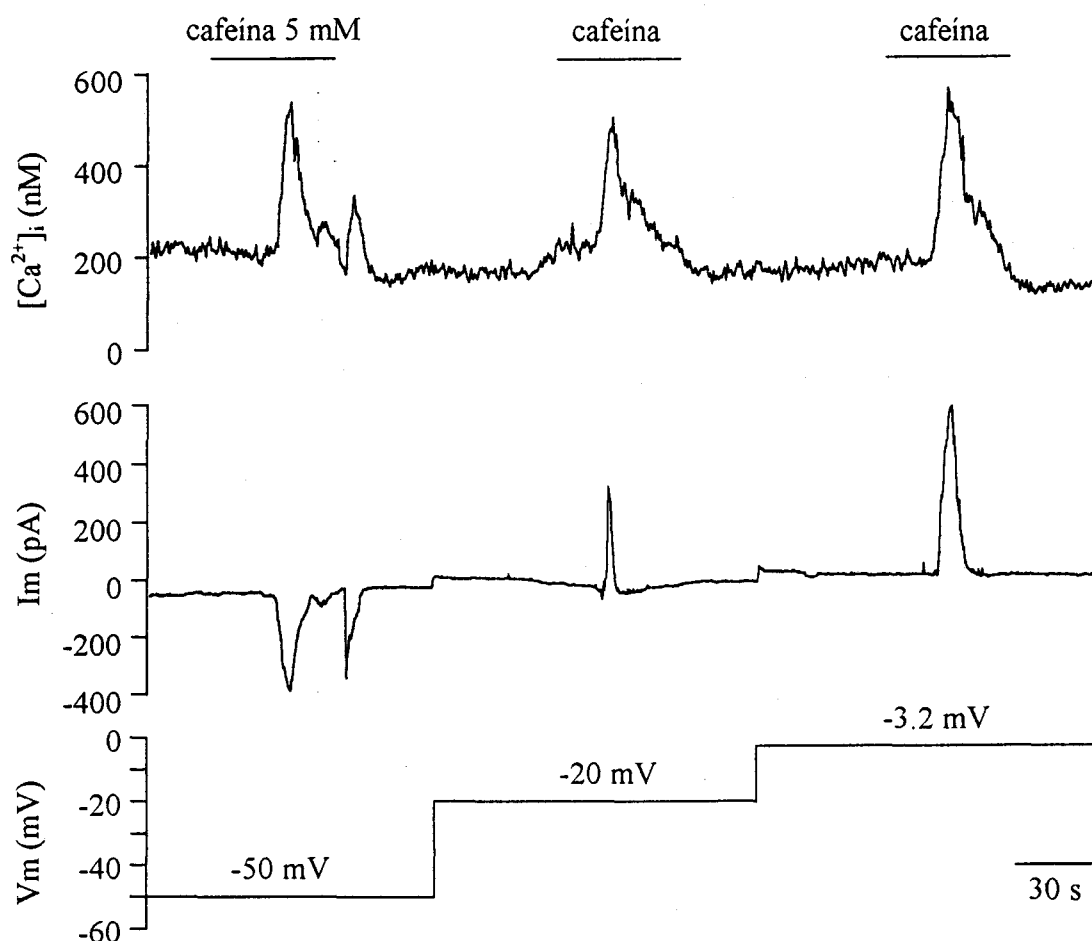


Figura 43. Corrientes iónicas generadas por la liberación de Ca^{2+} inducida por 5 mM cafeína y registradas a diferentes potenciales de membrana. El potencial de reversión está entre -50 mV y -20 mV, lejos del E_{Cl} . Solución interna 3, tabla 5 ($E_{Cl} = -3.2$ mV y $E_K = -99$ mV).

Estos resultados confirman los datos conseguidos con la solución interna 2 (tabla 5), ya que la liberación de Ca^{2+} en la mayoría de los miocitos de resistencia activa principalmente los canales de Cl_{Ca} , mientras que en los miocitos de conducción se activan fundamentalmente los canales de K_{Ca} .

3.2.2.3. Experimentos de fijación de voltaje y corriente realizados con la solución interna 4 ($[\text{Cl}^-]_i = 130 \text{ mM}$; $[\text{K}^+]_i = 0 \text{ mM}$; $E_{\text{Cl}} = -3.2 \text{ mV}$)

Dado que en los miocitos de conducción cuando el potencial de membrana es cercano al E_{Cl} se registraron fundamentalmente corrientes salientes, se diseñaron experimentos para determinar si el flujo de K^+ hacia el exterior de la célula era el responsable de estas corrientes salientes. Los experimentos se realizaron eliminando el K^+ del medio intracelular y sustituyéndolo por Cs^+ . En este caso, no se vio diferencia significativa de comportamiento entre los miocitos de conducción y los de resistencia, siendo los potenciales de reversión de las dos poblaciones de miocitos próximos al E_{Cl} (véase tabla 8). En la figura 44, se ilustra el comportamiento de los miocitos de conducción y de resistencia donde la subida de Ca^{2+} generó corrientes entrantes y salientes cuando se aplicó cafeína a la célula en potenciales inferiores y superiores respectivamente al E_{Cl} , mientras que la corriente registrada a -3.2 mV fue casi nula.

Cuando se realizaron los experimentos en la modalidad de fijación de corriente en los miocitos de conducción, los incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produjeron un desplazamiento del potencial de membrana hacia valores cercanos al E_{Cl} . En la figura 45 se muestran las respuestas a la estimulación de cafeína en un miocito de conducción registrados con las mismas condiciones experimentales utilizados en modo de fijación de voltaje. La primera aplicación de cafeína apenas provocó cambio en el potencial de membrana por ser cercano al E_{Cl} , sin embargo cuando mediante inyección de corriente se llevó el potencial de membrana a valores más negativos o más positivos que el E_{Cl} , la aplicación de cafeína indujo la despolarización y la hiperpolarización respectivamente del potencial de membrana y lo llevó a un valor próximo al E_{Cl} .

Miocitos de conducción y de resistencia

$E_{Cl} = -3.2 \text{ mV}$, 0 K^+ interno (fijación de voltaje)

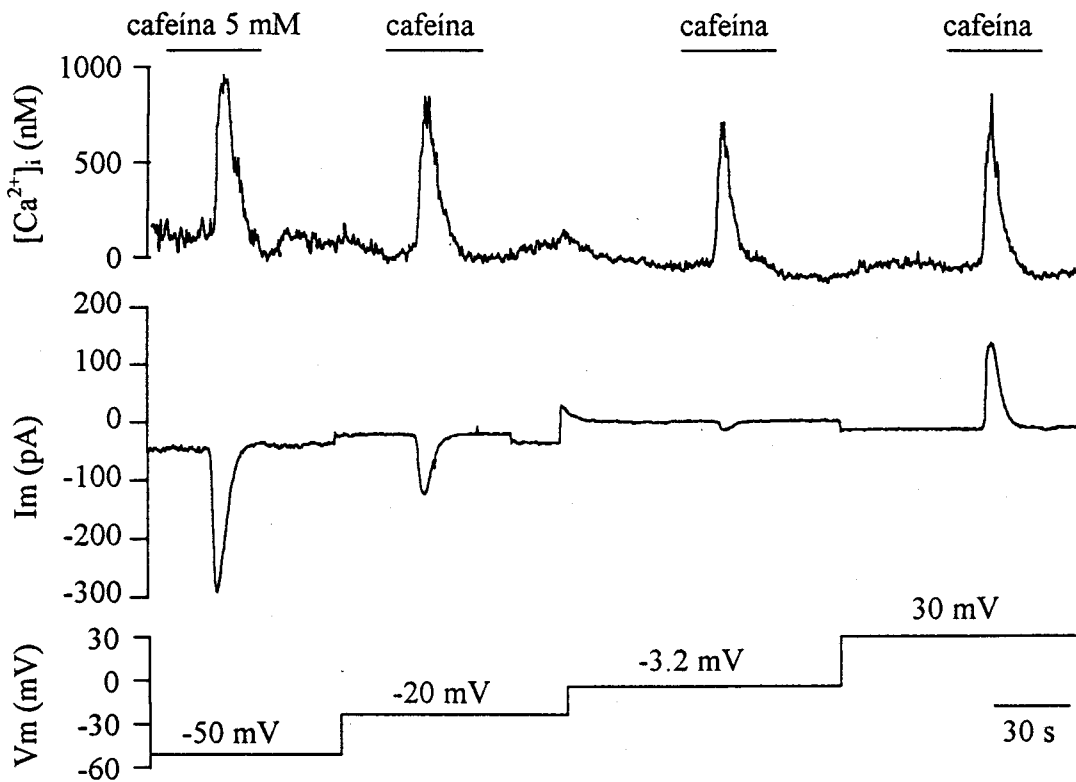


Figura 44. Corrientes iónicas generadas por el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por 5 mM cafeína y registradas a diferentes potenciales de membrana. El potencial de reversión es cercano al E_{Cl} . Solución interna 4, tabla 5 (0 K^+ , $E_{Cl} = -3.2 \text{ mV}$)

Esto muestra que efectivamente, la ausencia del ión K^+ en el medio intracelular hace que los miocitos de conducción se comporten como los de resistencia y tengan un potencial de reversión cercano al E_{Cl} , y confirman que la salida de K^+ hacia el medio extracelular es la responsable de las corrientes salientes registradas en los miocitos de conducción a potenciales cercanos al E_{Cl} , que no se vieron con tanta frecuencia en los miocitos de resistencia, cuando se mantuvo el ión K^+ en el medio intracelular.

Otros experimentos realizados con soluciones con menor $[Cl^-]_i$ ($E_{Cl} = -49.3 \text{ mV}$, $E_K = -99 \text{ mV}$), proporcionaron resultados cualitativamente similares a los descritos anteriormente, siendo los valores promedios de los potenciales de reversión de $-67.4 \pm 9 \text{ mV}$ en 7 de 11 miocitos de conducción estudiados y de $-36 \pm 10 \text{ mV}$ en 5 de 7 miocitos

de resistencia estudiados.

Los experimentos realizados mediante sustitución iónica sugieren por lo tanto que en los miocitos de conducción la relación $I_{K(Ca)}/I_{Cl(Ca)}$ es mayor que en los miocitos de resistencia, debido a la mayor proporción de canales de K_{Ca} en los primeros y de Cl_{Ca} en los segundos.

Miocitos de conducción y de resistencia

$E_{Cl} = -3.2 \text{ mV}$, 0 K^+ interno (fijación de corriente)

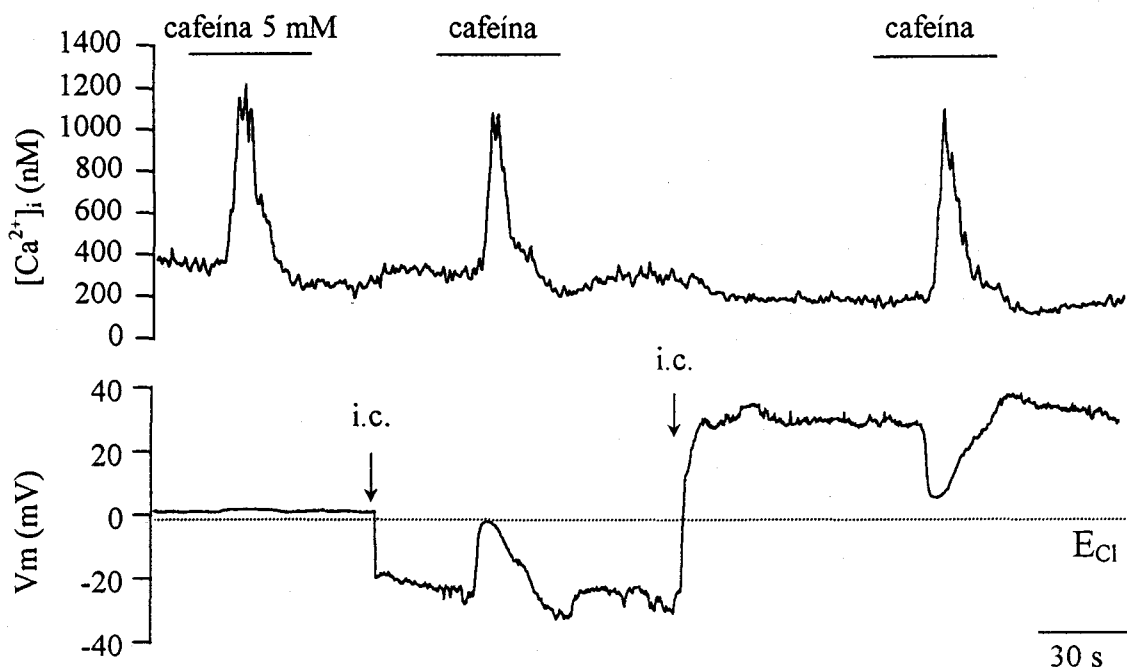
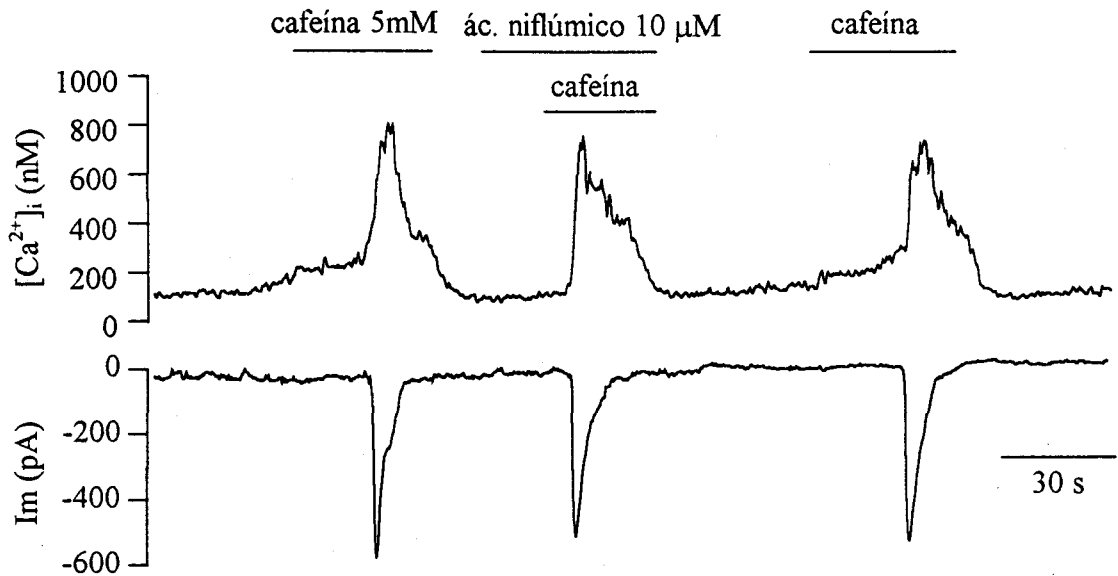


Figura 45. Cambios en el potencial de membrana producidos por la liberación de Ca^{2+} provocada por cafeína (5 mM). La primera exposición a cafeína no induce cambios en el potencial de membrana por ser éste próximo al E_{Cl} . En las otras aplicaciones de cafeína el potencial de membrana se desplaza hacia el E_{Cl} cuando aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. "i.c." representa el instante en el que se inyecta corriente. Solución interna 4, tabla 5 ($E_{Cl} = -3.2 \text{ mV}$).

3.3. Posible participación de otras conductancias iónicas reguladas por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico

La presencia de canales catiónicos regulados por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y su posible participación en la regulación del potencial de membrana en las células del tejido vascular ha sido estudiada por varios autores (Benham y col., 1985; Bae y col., 1999).

A Fijación de voltaje, $V_m = -70$ mV

B Fijación de corriente

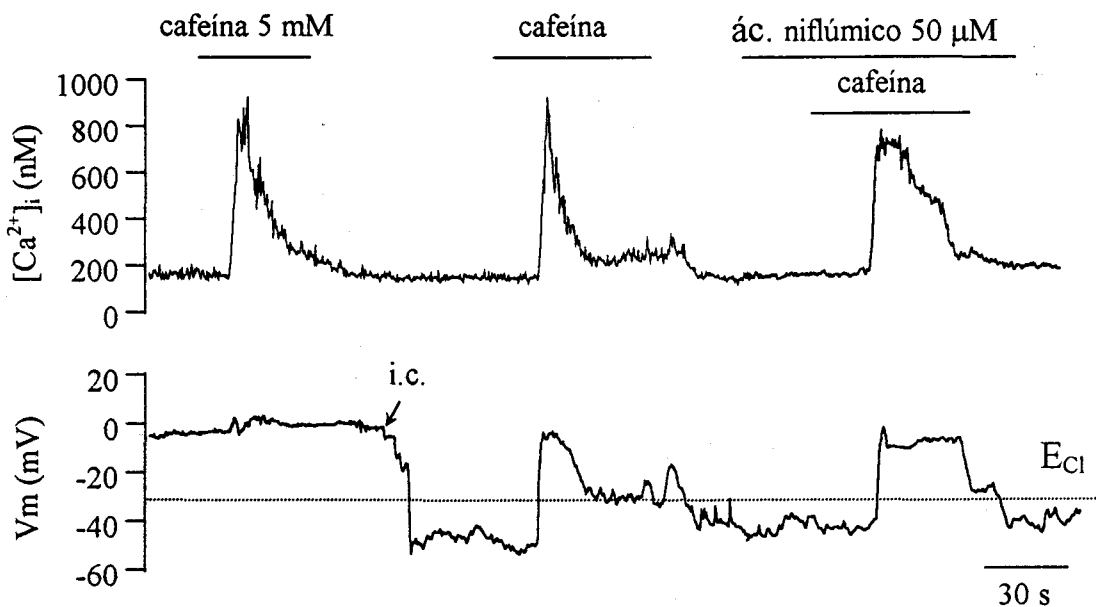


Figura 46. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocado por la cafeína (5 mM) puede activar conductancias distintas a K_{Ca} y Cl_{Ca} . A. Ausencia de efecto del bloqueante de los canales de Cl_{Ca} sobre la corriente entrante registrada a $V_m = -70$ mV. B. En fijación de corriente, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ desplaza el potencial de membrana hacia valores cercanos a 0 mV, sin apenas afectarse por el bloqueante. La primera exposición a cafeína, cuando el $V_m \approx 0$ mV, no produjo cambio en el potencial de membrana. Solución interna 2, tabla 5 ($E_{Cl} = -31$ mV y $E_K = -99$ mV).

En nuestra preparación, se observó en algunos casos que los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ llevaron el potencial de membrana de las células a valores despolarizados cercanos a 0 mV y la aplicación del ácido niflúmico, apenas afectó a las corrientes entrantes registradas a

potenciales hiperpolarizantes. Estos resultados sugieren la presencia de una conductancia catiónica inespecífica activada por Ca^{2+} en los miocitos pulmonares. En la figura 46 se representan los registros de dos células en configuración de fijación de voltaje y de corriente realizados con las soluciones de registro externa estándar y interna 2 (ver tabla 4 y 5). En fijación de voltaje (panel A), a -70 mV las espigas de Ca^{2+} producen corrientes entrantes que no se afectan por el ácido niflúmico. En modo de fijación de corriente (panel B), la primera liberación de Ca^{2+} provocada por cafeína apenas produjo cambio en el potencial de membrana por ser éste cercano a 0 mV, pero cuando se llevó el potencial de membrana a -50 mV mediante la inyección de corriente, la espiga de Ca^{2+} produjo una despolarización hasta un valor próximo a 0 mV, que no se afectó por la aplicación del ácido niflúmico.

Aunque no se realizaron experimentos para estudiar con detalles las conductancias dependientes de Ca^{2+} , nuestros resultados sugieren que los canales catiónicos junto a los canales de K_{Ca} y de Cl_{Ca} participan en la regulación del potencial de membrana de los miocitos pulmonares.

4. La regulación del potencial de membrana por el Ca^{2+} procedente de los reservorios determina la entrada del ión a través de los canales de Ca^{2+} dependientes del potencial

Como se ha descrito en los apartados anteriores, las subidas transitorias de Ca^{2+} citosólico, espontáneas o bien inducidas por la aplicación de agonistas, participan de una manera fundamental en el control del potencial de membrana mediante la regulación de las conductancias sensibles a Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática. La activación de estas conductancias puede tener un efecto directo sobre el potencial de membrana celular y en consecuencia sobre el tono vascular. En el caso de los canales de Cl_{Ca} , su apertura produciría la despolarización de la célula y la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente, lo cual favorecería la contracción (Yuan, 1997a). Sin embargo, la activación de los canales de K_{Ca} induciría la hiperpolarización del potencial de membrana y por lo tanto inhibiría la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente, lo cual provocaría la relajación del vaso (Huang y col., 1999).

4.1. Canales de calcio en los miocitos pulmonares

Experimentos previos realizados en nuestro grupo y en otros laboratorios (Franco-Obregón y col., 1995; Amenta y col., 1998), han mostrado que los miocitos de la arteria pulmonar tienen canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en la membrana plasmática.

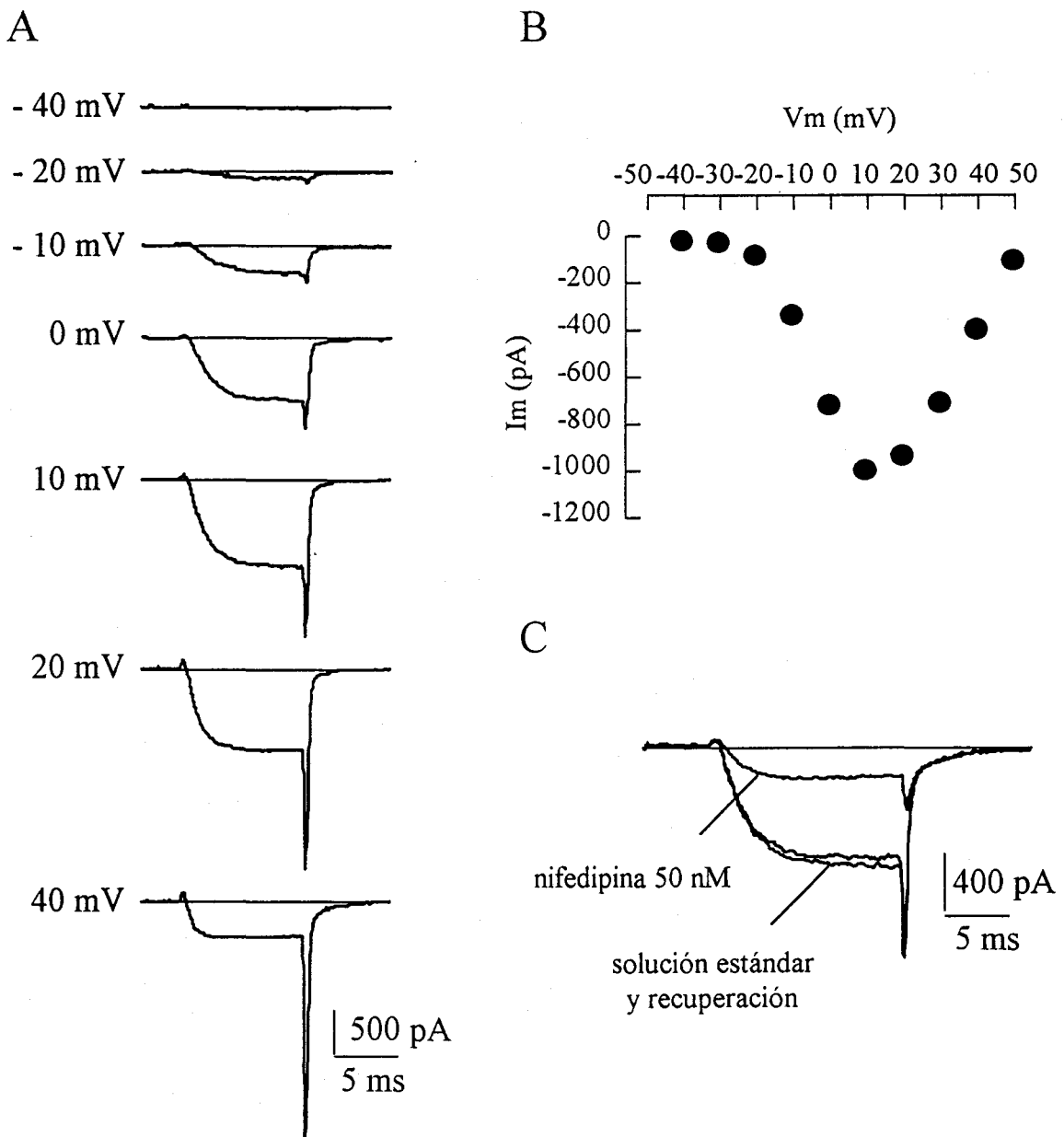


Figura 47. Corrientes macroscópicas de Ca^{2+} registradas en un miocito vascular de pulmón, originadas por el flujo del ión a través los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes. A. Registros de corrientes obtenidos a diferentes potenciales de membrana. Los pulsos despolarizantes de 10 ms de duración, se aplicaron desde -70 mV hasta los potenciales indicados. B. Curva I/V de los registros del panel A. El valor de pico de la intensidad se produce para $V_m = 10$ mV. C. Bloqueo reversible de la corriente macroscópica por nifedipina. Solución interna 130 Cs^+ , 5 EGTA, 5 BAPTA// solución externa 10 Ba^+ , 140 NaCl , 2.7 KCl .

La figura 47A muestra un ejemplo ilustrativo de la corriente iónica macroscópica que fluye a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes registrada en configuración de célula completa con la técnica de "patch-clamp". Esta corriente se obtiene mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 10 ms de duración a distintos potenciales de membrana desde un potencial de -70 mV. Los canales de Ca^{2+} conducen a partir de -20 mV y la corriente alcanza el pico en 10 mV y va disminuyendo a partir de este potencial. En la figura 47B se muestra la curva I/V típica de este comportamiento. Para determinar los canales de Ca^{2+} responsables de estas corrientes, se aplicaron pulsos despolarizantes desde -70 mV hasta 20 mV en presencia de nifedipina, bloqueante específico de los canales de Ca^{2+} tipo L. Como se muestra en la figura 47C la aplicación de 50 nM de nifedipina bloqueó reversiblemente la corriente de Ca^{2+} , lo que demuestra la presencia fundamental de los canales de calcio tipo L en las células de músculo liso vascular de pulmón.

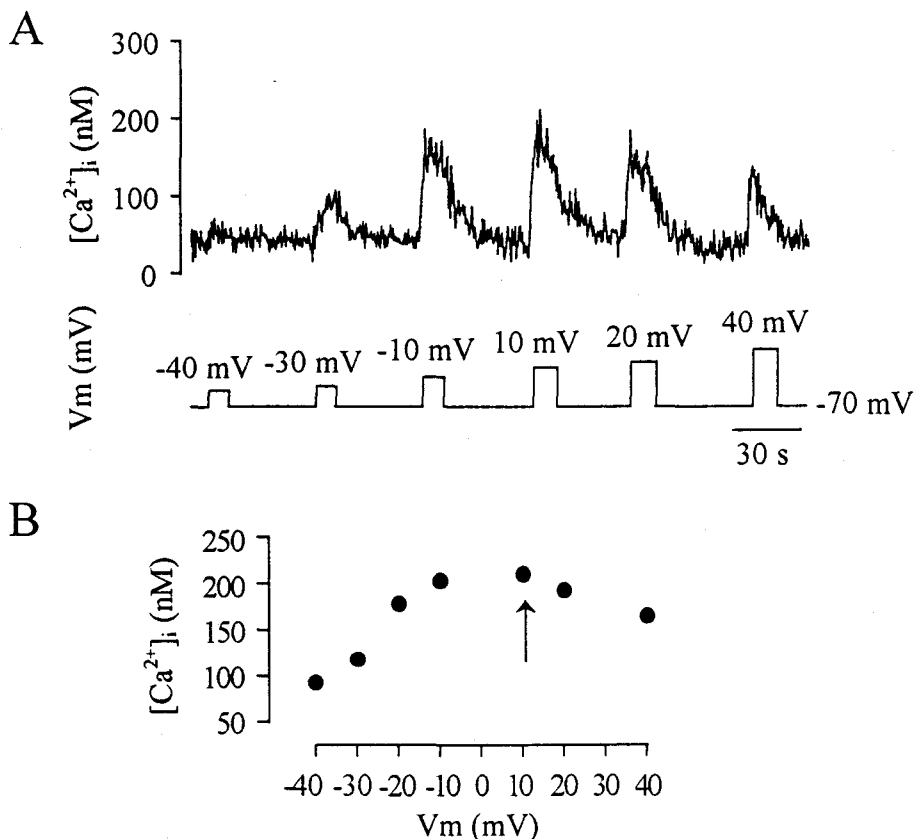


Figura 48. Incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por la aplicación de pulsos despolarizantes. A. Pulsos despolarizantes hasta el potencial indicado, de 10 s de duración, provocan incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes. B. Representación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ frente al potencial de membrana. La flecha indica el valor máximo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

El efecto de la apertura de los canales de Ca^{2+} sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se muestra en la figura 48, obtenida mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 10 s de duración y midiendo el incremento de Ca^{2+} citosólico que se produce como consecuencia de la despolarización. La figura 48A muestra un registro de los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenidos en respuesta a los pulsos despolarizantes aplicados desde -70 mV. Obsérvese cómo a -40 mV apenas se detecta el incremento de Ca^{2+} mientras que la concentración del ión alcanza un valor máximo cuando la despolarización es de 10 mV, a partir de la cual la amplitud de la señal de Ca^{2+} decrece con el potencial despolarizante. La representación del pico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ frente al potencial de membrana, proporciona una curva cuyo máximo está cercano a 10 mV, que cómo se mostró en la figura 47, corresponde con el potencial de membrana para el cual la amplitud de la corriente es máxima (Fig. 48B).

4.2. Participación de los canales de Cl_{Ca} en la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje

Para evidenciar de forma directa el papel que pueden jugar los canales de Cl_{Ca} en la despolarización de los miocitos pulmonares, y por consiguiente en la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje dependiente, se diseñaron experimentos en células sin dializar con objeto de no alterar el medio intracelular y que los cambios intrínsecos de la actividad eléctrica no fuesen controlados experimentalmente. Los registros se obtuvieron bien de miocitos aislados que presentaban oscilaciones espontáneas o de miocitos en los que se aplicó noradrenalina (NA), un agonista fisiológico de los receptores α -adrenergicos que estimula la formación de InsP_3 responsable de la movilización de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Wong y Klassen, 1993). La figura 49 muestra el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la aplicación de noradrenalina, en el que se aprecian dos componentes (Fig. 49A), uno inicial rápido seguido de otro lento de menor amplitud. La retirada de Ca^{2+} del medio extracelular, elimina reversiblemente el segundo componente, lo cual indica que éste se debe a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, mientras que el primer componente es fundamentalmente debido a la liberación de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico. En la figura 49B se comparan las respuestas de Ca^{2+} a noradrenalina señaladas con un asterisco en el panel A.

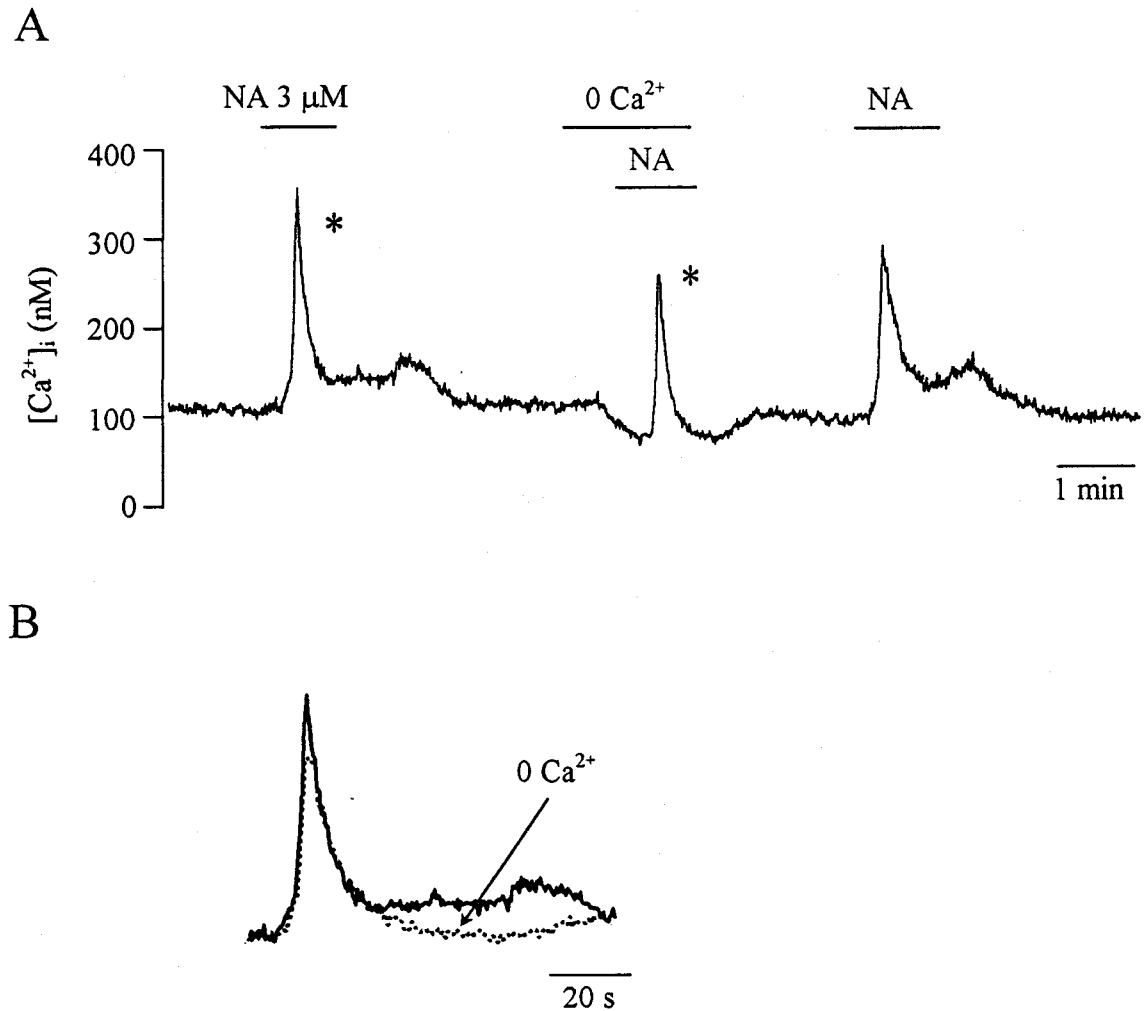


Figura 49. Incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ provocados por la aplicación de 3 μ M noradrenalina (NA) en células sin dializar. A. La aplicación de NA genera un incremento de Ca^{2+} con dos componentes. El segundo componente lento depende de la entrada de Ca^{2+} del medio externo. B. Superposición de las respuestas de Ca^{2+} a NA señaladas con * en el panel A.

Para identificar la vía de entrada del Ca^{2+} extracelular se realizaron experimentos bloqueando los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes con nifedipina. La figura 50 muestra el efecto de la nifedipina sobre el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en el caso de una célula que presenta oscilaciones espontáneas y en otra célula silente a la que se aplicó noradrenalina. En el primer caso (panel A), la nifedipina no bloqueó las espigas de Ca^{2+} pero sí disminuyó su duración. Como se muestra a la derecha de la figura, la duración de las oscilaciones espontáneas señaladas con un asterisco, superpuestas y ampliadas temporalmente, se hace menor en presencia de la nifedipina ya que elimina el segundo componente de las espigas.

En el registro del panel B, se muestra como la aplicación de noradrenalina provocó una señal de Ca^{2+} con los dos componentes. En esta célula la aplicación de la nifedipina bloquea reversiblemente el segundo componente confirmando que ésta se debe a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes.

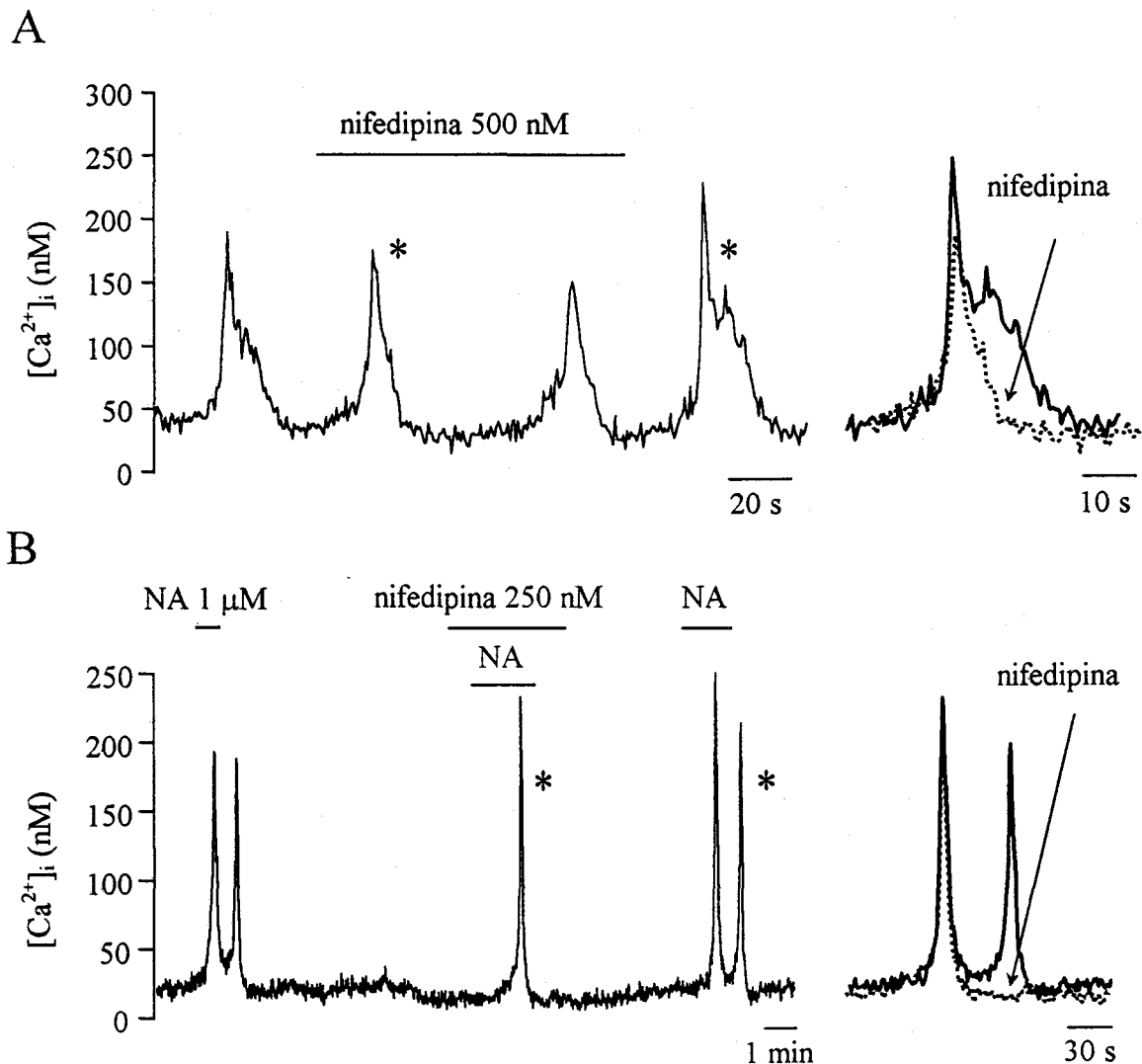


Figura 50. Efecto del bloqueo de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes sobre las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} o el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por 1 μM NA. A. Bloqueo del componente lento por nifedipina (500 nM) de las oscilaciones espontáneas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A la derecha se muestran las oscilaciones de Ca^{2+} señaladas con asterisco superpuestas y ampliadas temporalmente. B. Bloqueo de la nifedipina (250 nM) del segundo componente de la respuesta de Ca^{2+} a la aplicación de NA. A la derecha, se representan las respuestas de Ca^{2+} a NA señaladas con asterisco superpuestas y ampliadas temporalmente.

Finalmente, se realizaron experimentos para determinar si la activación de los canales de Cl_{Ca} , en respuesta a la liberación inicial de Ca^{2+} , contribuye a la despolarización de las

células. La figura 51A muestra el bloqueo reversible del segundo componente de la respuesta a noradrenalina por la aplicación de ácido niflúmico. Obsérvese como en la figura 51B la superposición y ampliación de las respuestas indicadas con un asterisco muestran un bloqueo casi total del segundo componente de la respuesta de Ca^{2+} por el ácido niflúmico. Por lo tanto la activación de los canales de Cl_{Ca} debido a la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares por la aplicación de la noradrenalina, hace que se despolarize la célula, lo que induciría la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, que sería responsable del segundo componente de la señal de Ca^{2+} .

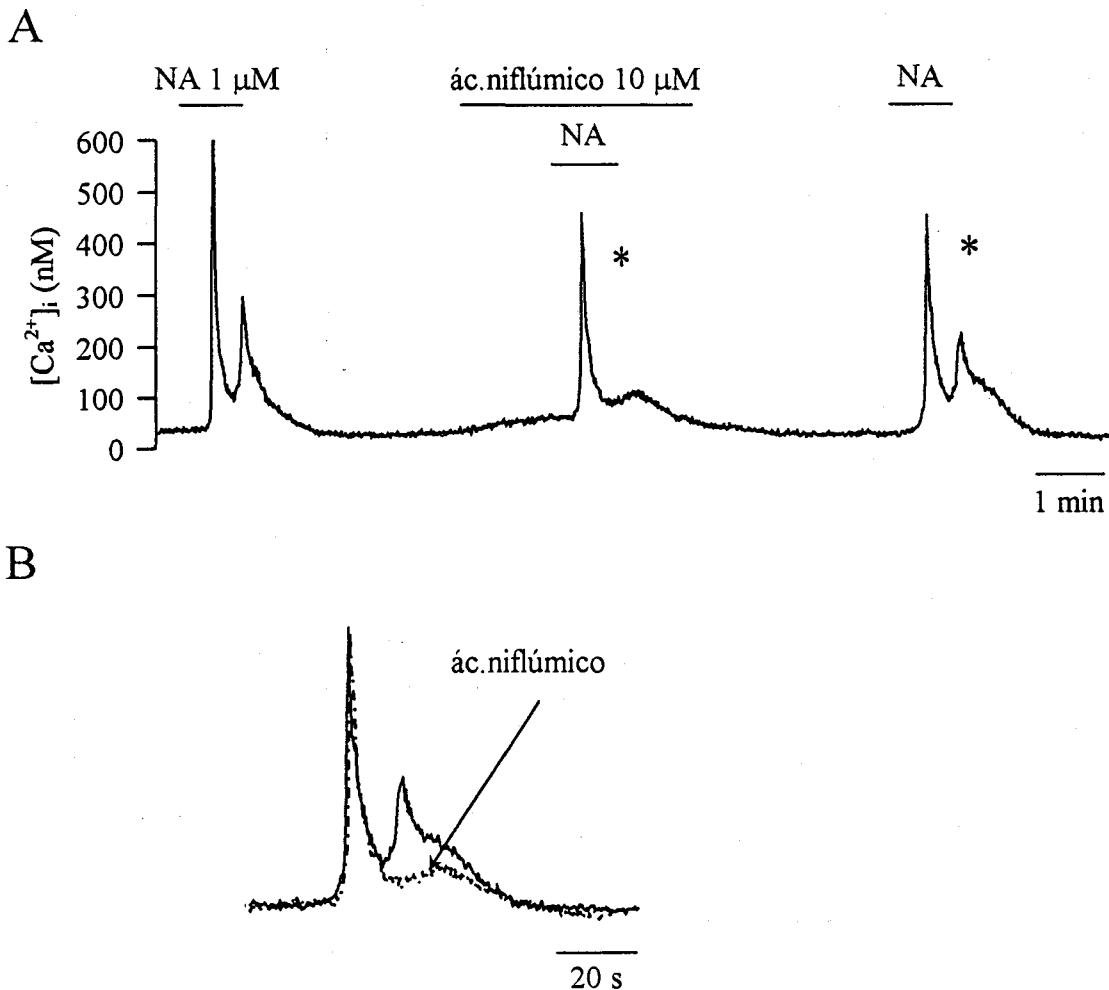


Figura 51. Papel de los canales de Cl^- regulados por Ca^{2+} en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocado por $1 \mu\text{M}$ NA. A. Bloqueo del segundo componente de la respuesta de Ca^{2+} a NA por $10 \mu\text{M}$ ácido niflúmico lo que indica la participación de los canales Cl_{Ca} . B. Representación de las señales de Ca^{2+} , señalados con asterisco, escaladas y superpuestas.

La respuesta de Ca^{2+} a NA con los dos componentes fue registrada en los miocitos de conducción y fundamentalmente de resistencia donde predominen los canales de Cl_{Ca} , ya que, como se ha demostrado, el segundo componente se debe al flujo del ión Ca^{2+} a través los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes que se abren cuando se despolariza la célula como consecuencia de la activación de los Cl_{Ca} por la liberación del ión del reservorio intracelular, mediada por InsP_3 . En los miocitos donde predominen los canales de K_{Ca} , fundamentalmente los de conducción, la respuesta de Ca^{2+} fue una espiga con un único componente debido esencialmente a la liberación de Ca^{2+} dependiente de InsP_3 . Por lo cual, el mismo agente, actuando sobre el mismo receptor, puede producir diferentes efectos vasomotores dependiendo del nivel de expresión de los canales K_{Ca} y Cl_{Ca} en los miocitos pulmonares.

DISCUSION

En el presente trabajo se ha estudiado la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos aislados de la arteria pulmonar y el efecto de la liberación del ión de los almacenes intracelulares sobre las conductancias iónicas presentes en la membrana plasmática. Los resultados indican que tanto la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ como los efectos electrofisiológicos que se derivan de los cambios de los niveles de Ca^{2+} intracelulares dependen de la localización de los miocitos a lo largo del árbol arterial pulmonar. Aunque los dos tipos de receptores que existen en el RS (receptor para $InsP_3$ y para rianodina) se encuentran en todos los miocitos, parece observarse una especialización de estos al menos en la forma en que participan en la génesis de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} (espigas de Ca^{2+}). El receptor para $InsP_3$ se activa preferentemente durante las oscilaciones de Ca^{2+} en los miocitos de conducción, mientras que en los miocitos de resistencia tiene preponderancia funcional el receptor para rianodina. En paralelo a estas diferencias en las dos poblaciones de miocitos pulmonares existen especializaciones electrofisiológicas de importancia funcional muy relevantes. En los miocitos de conducción predominan los canales de K_{Ca} sobre los de Cl_{Ca} , y en los miocitos de resistencia prevalecen los canales de Cl_{Ca} de la membrana plasmática.

1. Oscilaciones de Ca^{2+} en células de músculo liso arterial pulmonar

El primer objetivo de este trabajo fue el poner a punto la cuantificación de los niveles de Ca^{2+} intracelulares para poder estudiar las variaciones espontáneas o inducidas por diferentes agentes y/o situaciones fisiológicas. Los resultados obtenidos en la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con la calibración “in vitro” e “in vivo” son cualitativamente similares a los descritos en otros laboratorios. En células cromafines, usando los mismos métodos de calibración, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultante de la calibración “in vivo” fue de aproximadamente 2 veces los valores obtenidos con la calibración “in vitro” (Agustine y Neher, 1992). En nuestra preparación este factor varía entre 1.24 y 1.7 (véase figura 11). En miocitos aislados procedentes de arterias cerebrales, los valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenidos mediante la calibración “in vitro”, utilizando una pipeta de registro para introducir el Fura-2 en su forma salina y restando el 15% a los valores de R_{\min} y R_{\max} , asociados a la viscosidad del citosol (Poenie, 1990), dan valores de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ similares a las registradas en nuestros experimentos (Kamishima y McCarron, 1997). Por este motivo, la calibración “in vivo” parece ser el mejor método para la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ya que tiene en cuenta el entorno y las condiciones del citoplasma celular.

Nuestros resultados muestran que un número importante de los miocitos dispersos presentan oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico espontáneas o inducidas por agonistas (ATP, cafeína o noradrenalina). Oscilaciones espontáneas de similares características se han registrado en músculo liso de la arteria carótida (Désilet y col., 1989) y en monocapas de la línea celular A7r5 de aorta (Byron y Taylor, 1993). Oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y/o corrientes iónicas en miocitos pulmonares han sido descritas por otros autores, tras la aplicación de agentes vasoactivos como ATP (Guibert y col., 1996a), cafeína (Lee y Earm, 1994), angiotensina-II (Guibert y col., 1996b), fenilefrina (Hamada y col., 1997), histamina (Wang y large, 1993) y endotelina-1 (Hyvelin y col., 1988).

Las oscilaciones de Ca^{2+} de los miocitos arteriales pulmonares se deben fundamentalmente a la liberación del ión del retículo sarcoplásmico (RS) y se regulan en amplitud y frecuencia por el Ca^{2+} externo de manera cualitativamente similar a la descrita con las oscilaciones generadas por la aplicación de acetilcolina en miocitos procedentes de la tráquea (Prakash y col., 1997). Algunos autores han descrito en el

músculo liso vascular la existencia de osciladores dependientes de variaciones en el potencial de membrana causadas por cambios en la actividad de la ATPasa-Na⁺-K⁺ o en las conductancias de la membrana plasmática (Mulvany, 1988; Sabouni y Mustafá, 1989). Igualmente, en miocitos procedentes de arteria pulmonar, se han registrado cambios en la [Ca²⁺]_i asociados a los potenciales de acción, generados como consecuencia de las despolarizaciones inducidas por la aplicación de 4 AP o TEA, que fueron bloqueados por diltiazem y cuando se suprimió el Ca²⁺ del medio extracelular (Ousterhout y Sperelakis, 1987; Yuan y col., 1996). Como se indicó anteriormente, en nuestras condiciones experimentales las oscilaciones de la [Ca²⁺]_i, aunque moduladas por el Ca²⁺ extracelular, se originaron primariamente por la liberación del ión de los almacenes intracelulares.

Aunque los mecanismos que originan y mantienen las oscilaciones de Ca²⁺ no se conocen con detalle, se ha propuesto que éstas se disparan por la sobrecarga del ión en el RS (Missiaen y col., 1991), lo cual activa sincrónicamente un gran número de receptores del almacén y provoca la liberación de Ca²⁺ al citosol que se desplaza en forma de onda en el interior de la célula (Wier y Blatter, 1991; Berridge, 1997). Usando técnicas de imagen se ha observado en miocitos de la vena porta una cierta colocalización en el citosol de los “sparks” de Ca²⁺ que se generan cuando se libera Ca²⁺ como consecuencia de la apertura de uno o un grupo pequeño de receptores intracelulares de Ca²⁺ y el lugar de inicio de las oscilaciones (Mironneau y col., 1996). Nuestro sistema de registro no permitió la resolución de “sparks” de Ca²⁺ y el desplazamiento de la onda de calcio se detectó como una oscilación o espiga que representa cambios globales de la [Ca²⁺] en la célula estudiada.

Las oscilaciones de la [Ca²⁺]_i se producen también en miocitos arteriales “in situ” formando parte de sistemas integrados. Por ejemplo, la aplicación de noradrenalina o la estimulación eléctrica de las fibras nerviosas simpáticas da lugar a oscilaciones de Ca²⁺ en células musculares lisas de la pared arterial de la cola de rata (Iino y col., 1994; Asada y col., 1999). Igualmente, se han descrito oscilaciones de la [Ca²⁺]_i en miocitos intactos de la arteria mesentérica. Estas oscilaciones se observaron incluso en ausencia de Ca²⁺ extracelular y se bloquearon por tapsigargina, lo que indica la participación del retículo sarcoplásmico en su génesis (Miriel y col., 1999). Por lo tanto, las oscilaciones de la [Ca²⁺]_i no son un epifenómeno resultante de la dispersión

celular sino que aparecen en las células de sistemas integrados, por lo que se cree que éstas participan de forma importante en la regulación de la contractilidad de la fibra muscular lisa vascular.

2. Participación diferencial de los receptores para rianodina e InsP_3 en la generación de las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en miocitos del árbol arterial pulmonar

Una de las observaciones experimentales de mayor trascendencia en este trabajo ha sido el poner de manifiesto que los receptores para InsP_3 y rianodina intervienen distintamente en la generación de las oscilaciones de Ca^{2+} en miocitos procedentes de las arterias de resistencia y de conducción. Esta idea se sustenta en tres tipos de argumentos: i) el efecto distinto sobre las oscilaciones de los bloqueantes de los receptores del RS y de inhibidores de la fosfolipasa C; ii) la regulación diferencial de las oscilaciones por el AMPc; y iii) la variabilidad en el retraso existente entre el inicio de las oscilaciones de Ca^{2+} y de las corrientes iónicas transmembranarias que se generan por activación de conductancias Ca^{2+} -dependientes.

2.1. Efecto de la inhibición de los receptores del retículo sarcoplásmico y de la fosfolipasa C sobre las oscilaciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

La aplicación de rianodina produjo interrupción de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en casi todos los miocitos de resistencia pero tuvo poco efecto en los miocitos de conducción. Contrariamente, los inhibidores de la fosfolipasa C (U-73122) o del receptor para InsP_3 (heparina) abolieron las oscilaciones espontáneas en miocitos de conducción con efecto casi inapreciable en miocitos de resistencia. Por lo tanto, existe una especialización longitudinal de la participación de los dos tipos de receptores del RS en la génesis de las oscilaciones. El RyR actúa fundamentalmente en miocitos de resistencia y el InsP_3R en miocitos de conducción. En el caso de los miocitos de resistencia, la inhibición de las espigas por rianodina se acompañó generalmente de una subida de Ca^{2+} , posiblemente debido al decrecimiento del "buffering" de Ca^{2+} y/o a la estimulación de la entrada capacitativa de Ca^{2+} del medio externo que sigue al vaciado del almacén sensible a rianodina (Cheek y col., 1990; Putney, 1990). Es por lo

tanto posible que las oscilaciones fuesen generadas por la activación del receptor para InsP_3 y que el efecto de la rianodina se debiese al incremento de Ca^{2+} , el cual interrumpe las oscilaciones mediadas por InsP_3 (Parker e Ivorra, 1990). Sin embargo, la falta de efecto sobre las oscilaciones de inhibidores de la fosfolipasa C y de los bloqueantes del receptor para InsP_3 indican que éstas se generan fundamentalmente por la activación del RyR. Efectos diferenciales de la rianodina también se han observado en tejido muscular liso del intestino donde la rianodina es capaz de contraer las células musculares longitudinales pero no las circulares (Kuemmerle y col., 1994). La variabilidad funcional de la respuesta a rianodina de las células musculares lisas posiblemente se debe a los niveles variables de expresión de RyR. En miocitos de uréter, por ejemplo, los RyRs se expresan en cantidad muy inferior a los InsP_3Rs (Macrez y Mironneau, 1999).

Las oscilaciones registradas en presencia de ATP también se regulan diferencialmente por los inhibidores de los receptores intracelulares del retículo sarcoplásmico y de la formación de InsP_3 según la procedencia del miocito. En la mayoría de los miocitos de conducción las espigas de Ca^{2+} inducidas por ATP no se afectan por rianodina pero sí por la inhibición de la fosfolipasa C, mostrando que el ATP parece provocar únicamente la liberación de Ca^{2+} mediada por la activación de InsP_3R . Sin embargo, en la mayoría de los miocitos de resistencia las oscilaciones inducidas por ATP son sensibles a rianodina, mientras que la inhibición de la fosfolipasa C no tiene efecto tan dramático sobre las oscilaciones, un hecho que puede estar relacionado a la estimulación de los RyRs por la liberación de Ca^{2+} iniciada por la activación del InsP_3R debido a la aplicación de ATP. Resultados parecidos han sido observados en otras preparaciones (miocitos de vena porta, del duodeno y un clon de células de aorta) donde se ha atribuido a los RyRs un papel crucial en la amplificación y la propagación de los eventos de Ca^{2+} mediados tanto por Ca^{2+} como por InsP_3 (Blatter y Weir, 1991; Arnaudeau y col., 1997; Boittin y col., 1998 y 1999).

2.2. Diferencias longitudinales en la regulación de las oscilaciones de Ca^{2+} por el AMPc

Además de la participación diferencial de los InsP_3Rs y RyRs en la génesis de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en los miocitos de conducción y resistencia, nuestros

resultados muestran que el AMPc tiene efectos distintos sobre la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$ en cada una de estas poblaciones celulares. El incremento de AMPc (bien por inhibición de la fosfodiesterasa o por estimulación de la adenilciclase) produce inhibición de la génesis de las oscilaciones espontáneas en miocitos de conducción, mientras que se observa una ausencia de efecto o incluso potenciación de las oscilaciones en miocitos de resistencia. La interrupción de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en los miocitos de conducción por el AMPc sugiere que éste podría inhibir la liberación de Ca^{2+} mediada por $InsP_3$, ya que un efecto similar ha sido descrito por otros autores sobre la liberación de Ca^{2+} producida por carbacol en células musculares gástricas (Ding y col., 1997) y sobre las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por ATP tanto en megacariocitos aislados de médula ósea como en miocitos de arteria pulmonar (Uneyama y col., 1993; Guibert y col., 1996a). Este resultado favorece nuestra propuesta discutida en el párrafo anterior indicando que las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en los miocitos de conducción se deben a la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico mediada por $InsP_3$.

Por el contrario, la ausencia de efecto o la potenciación de las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} por el AMPc observada en algunos miocitos de resistencia apoya el que en estas oscilaciones participe preferentemente el receptor para rianodina. El efecto potenciador del AMPc sobre las espigas de Ca^{2+} en algunos miocitos de resistencia podría deberse al incremento de la actividad del receptor para rianodina por la fosforilación dependiente de AMPc que ha sido descrito en neuronas (Yoshida y col., 1992) o en células beta del páncreas (Islam y col., 1998). No obstante, es probable que en muchos miocitos de resistencia la estimulación de los RyRs por AMPc no se ponga de manifiesto de forma clara (ausencia de efecto) debido a la disminución de la liberación de Ca^{2+} mediada por $InsP_3$ que en ciertas circunstancias (como por ejemplo al aplicar ATP) actúa como cebador de la función de los RyRs.

2.3. Retraso entre las oscilaciones de Ca^{2+} y las corrientes transmembranarias

Como se discute en el apartado 3 de "Discusión" las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ que se producen en los miocitos pulmonares disparan cambios del potencial de membrana por la activación de conductancias iónicas de la membrana plasmática (de potasio y

cloro) que se activan por la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. El análisis de los retrasos entre la subida de Ca^{2+} debido a las oscilaciones espontáneas o a la aplicación de cafeína y las corrientes generadas en los miocitos de conducción y de resistencia indican que sólo es significativamente diferente, respecto de los demás, el retraso existente entre las oscilaciones espontáneas de Ca^{2+} en los miocitos de conducción y la correspondiente corriente (véase tabla 7). Esta observación podría estar asociada al hecho de que la cafeína activa el receptor para rianodina en los dos tipos de miocitos, mientras que durante las oscilaciones espontáneas se activa el receptor para $InsP_3$ en miocitos de conducción y el receptor para rianodina en miocitos de resistencia. Por lo tanto, las evidencias experimentales indican que en los miocitos de arteria pulmonar las oscilaciones espontáneas se deben fundamentalmente a la descarga del retículo sarcoplásmico por la activación de los receptores para rianodina e $InsP_3$ en miocitos de resistencia y de conducción respectivamente.

En conclusión, los datos experimentales sugieren que las oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en los miocitos vasculares del pulmón se deben a la activación de receptores de liberación de Ca^{2+} distintos dependiendo de la localización del miocito: $InsP_3Rs$ en miocitos de conducción y $RyRs$ en miocitos de resistencia. Hemos demostrado además que el AMPc intracelular modula de forma diferencial estos receptores y proponemos que el Ca^{2+} liberado por $InsP_3R$ en miocitos de resistencia actúa como cebador para el RyR potenciando la liberación de Ca^{2+} en estos miocitos. Se ha sugerido en trabajos previos que los miocitos vasculares pueden ser heterogéneos con respecto a la liberación de Ca^{2+} de reservorios (Shin y col., 1991) sin embargo, no existen precedentes en la literatura que muestren la distribución diferencial de $InsP_3Rs$ y $RyRs$ observada en el presente estudio. Nuestros resultados, basados en datos funcionales, pueden explicarse por una variabilidad en la distribución topográfica de receptores o en la expresión de los mismos en los diferentes tipos de miocitos. En este sentido, se sabe que existen células (como los miocitos de la vena porta de rata) donde predomina la expresión de $RyRs$ con respecto a los $InsP_3Rs$ (Boittin y col., 1999), mientras que lo opuesto se observa en músculo liso de uréter de rata (Macrez y Mironneau, 1999). Nuestro trabajo actual debe por lo tanto estimular estudios futuros donde con técnicas

de biología celular y molecular se muestre la expresión diferencial de los InsP_3Rs y RyRs a lo largo del árbol arterial pulmonar.

3. Especialización electrofisiológica en los miocitos de la arteria pulmonar

La medida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ conjuntamente con la actividad eléctrica (potencial de membrana y/o corrientes iónicas) ha permitido determinar la existencia de especializaciones funcionales en los miocitos procedentes de las arterias de conducción y resistencia. Estas características resultan de la distribución diferencial de los canales de Cl^- y K^+ activados por Ca^{2+} (Cl_{Ca} y K_{Ca} respectivamente) y la influencia de estos canales sobre el potencial de membrana y la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular. En miocitos de conducción la liberación de Ca^{2+} de forma espontánea o inducida por agonistas provocó la activación de canales de Cl_{Ca} y K_{Ca} , dando lugar a que el potencial de membrana adquiriese valores entre E_{Cl} y E_{K} (≈ -30 y ≈ -90 mV respectivamente). Aunque la respuesta varió en la población de miocitos de conducción, el efecto más común que acompañó a la subida de Ca^{2+} fue la hiperpolarización, debido al predominio de los canales de K_{Ca} sobre los canales de Cl_{Ca} . Al contrario, en la mayoría de los miocitos de resistencia la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produjo generalmente una despolarización del potencial de membrana hacia valores cercanos al E_{Cl} o más positivos. Los experimentos realizados con soluciones de diferente composición iónica y con el uso de bloqueantes selectivos de los canales de Cl_{Ca} y K_{Ca} sugieren que los primeros están relativamente más concentrados en los miocitos de resistencia y que los segundos (K_{Ca}) predominan en los miocitos de conducción.

Una observación interesante en miocitos de conducción es la activación de una corriente con forma de W con un componente saliente entre dos entrantes registrada a potenciales intermedios entre E_{Cl} y E_{K} . Los componentes entrantes estarían relacionados con la activación de los canales de Cl_{Ca} ya que estos son más sensibles al Ca^{2+} que los canales de K_{Ca} como han descrito otros autores (Bakhrarov y col., 1996; Carl y col., 1996). Por tanto los canales de Cl_{Ca} podrían activarse durante la fase de subida y bajada de la espiga, habiéndose descrito que el umbral de activación para las corrientes de Cl_{Ca} en músculo liso arterial de vena porta, es de 180 nM (Pacaud y col., 1992). Cuando la concentración de Ca^{2+} fuese elevada, se abrirían los canales de K_{Ca}

(corriente que correspondería al componente saliente) los cuales se inactivarían a concentraciones micromolares de Ca^{2+} , como ha sido descrito en neuronas (Hicks y Marrion, 1998) y en músculo liso (Hogg y col., 1993a; Muñoz y col., 1998).

La especialización funcional y molecular de los miocitos en las arterias es un concepto reciente que ayuda a entender la gran variedad de comportamiento de las células de músculo liso procedentes de diferentes arterias o bien de diferentes segmentos de una misma arteria y a explicar la gran variabilidad en la respuesta a estímulos excitadores e inhibidores en diferentes vasos o en diferentes segmentos de un mismo vaso. Se han descrito dos tipos de miocitos en la aorta de conejo basados en la distribución desigual de la isoforma de la miosina (Pauletto y col., 1991), así como dos poblaciones distintas de miocitos en cultivo de aorta, unos alargados que se despolarizan en respuesta de la aplicación de agonistas vasoactivos como consecuencia de la activación de los canales de Cl_{Ca} y catiónicos, y otros, con una forma parecida a las células epiteliales, que se hiperpolarizan en respuesta a los mismos agonistas, gracias a la activación de los canales K_{Ca} (Neylon y col., 1994).

Con respecto a las arterias pulmonares, existen varios estudios recientes mostrando la existencia de especificidades moleculares en miocitos de resistencia y conducción. Se sabe que los miocitos pulmonares contienen diferentes subtipos de canales de potasio (Albarwani y col., 1995; Archer y col., 1996). Archer y col., (1996), por su parte, han descrito la presencia de tres tipos diferentes de miocitos dependiendo del tipo de canales de K^{+} que contribuyen en la corriente iónica macroscópica (los K_{Ca} , los de rectificación retardada " K_{DR} " o los que tienen los dos). En los miocitos de conducción han determinado, además, una mayor concentración de los canales de K_{Ca} , mientras que en los de resistencia se encuentran especialmente los miocitos K_{DR} y los que poseen los dos canales. Estos resultados, aunque obtenidos con diferente metodología y perspectiva, son similares a los observados en este trabajo. En los miocitos de conducción predominan fundamentalmente los canales de K_{Ca} o mezclados con Cl_{Ca} , mientras que los miocitos de resistencia forman una población más homogénea con predominio de los canales de Cl_{Ca} . Sin embargo, Clapp y col., (1996) sugieren una mayor presencia de los canales de Cl_{Ca} en miocitos de conducción que en los miocitos de resistencia lo cual puede ser debido al distinto proceder experimental y al análisis estadístico realizado. Estos autores utilizan compuestos

enjaulados de Ca^{2+} y el análisis estadístico lo realizaron sobre la totalidad de células estudiadas, mientras que nosotros lo hemos realizado sobre las células que presentan una respuesta a un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Además, ya que los miocitos de resistencia se dañan más con la dispersión enzimática que los miocitos de conducción podría ser que los primeros respondiesen peor a cambios en los niveles de Ca^{2+} intracelular.

Además de las variaciones en la proporción de canales de K_{Ca} y de Cl_{Ca} , en nuestro grupo se ha determinado una distribución diferencial de canales de Ca^{2+} tipo L en la vasculatura pulmonar. Los canales tipo L se encuentran más concentrados en miocitos del tronco de la arteria pulmonar que en arterias sistémicas (femoral, celiaca o mesentérica) y más en miocitos pulmonares de resistencia que en miocitos de conducción (Franco-Ogrogón y López-Barneo, 1996; Ureña y col., 1996).

4. Repercusiones fisiológicas de las propiedades celulares diferenciales de miocitos de resistencia y conducción

La liberación de Ca^{2+} mediada por el retículo sarcoplásmico y la entrada de Ca^{2+} del medio extracelular son factores críticos que determinan el estado de contracción de las células de músculo liso arterial, variables fundamentales para la regulación del tono vascular (Somlyo y Somlyo, 1994). La existencia de diferentes tipos de células con propiedades electrofisiológicas diferentes distribuidas desigualmente en el árbol arterial pulmonar facilita la comprensión de las respuestas de las arterias pulmonares a fármacos y agentes vasoactivos.

La concentración de miocitos donde predominan los canales de Cl_{Ca} en ramas tiene especial consecuencia funcional, porque es en este lugar donde fundamentalmente se lleva a cabo la regulación del tono vascular en el pulmón. Por ejemplo, se conoce que la vasoconstricción hipóxica pulmonar ocurre en vasos pequeños intrapulmonares mientras que las grandes arterias se dilatan o tienen una respuesta bifásica (contracción seguida de dilatación) (Bennie y col., 1991; Wadsworth, 1994; Archer y col., 1996). Se sabe que la hipoxia inhibe los canales K_{DR} (Yuan y col., 1993; Post y col., 1995; Archer y col., 1996) e incrementa la entrada de Ca^{2+} y el Ca^{2+} citosólico en miocitos de resistencia (Vadula y col., 1993; Franco-Ogrogón y López-Barneo, 1996; Ureña y col., 1996; Bakhranov y col., 1998). La

presencia en miocitos de resistencia de canales de Cl_{Ca} , activados a relativamente bajos niveles de Ca^{2+} citosólico, tiene posiblemente un papel crítico en la potenciación y mantenimiento de la vasoconstricción a hipoxia, ya que la apertura de estos canales, por la subida de Ca^{2+} citosólico debido a la liberación del RS o a la entrada del medio externo de Ca^{2+} , despolarizaría la célula cerca de -20 o -30 mV (E_{Cl} en músculo liso vascular) lo que favorecería la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en la membrana plasmática. En miocitos de conducción, la falta de canales K_{DR} sensibles a O_2 (Archer y col., 1996) y la inhibición de los canales de Ca^{2+} por hipoxia (Franco-Obregón y López-Barneo, 1996; Ureña y col., 1996; Bakhramov y col., 1998) pueden constituir los mecanismos causantes de la vasodilatación. Sin embargo, el predominio en estos miocitos de los canales de K_{Ca} , asegura que ante incrementos de la $[Ca^{2+}]$ citosólico, se produzca solamente una vasoconstricción transitoria, ya que la activación de estos canales induciría la hiperpolarización de la membrana y la vasodilatación (Nelson y col., 1995). Al contrario que la hipoxia, los agentes vasomotores como el NO que activan fundamentalmente canales de K_{Ca} , regulan fundamentalmente el tono de las grandes arterias de conducción (Archer y col., 1994 y 1996).

Existen numerosos agentes vasoactivos, como ATP, endotelina-1, fenilefrina o NA, que regulan el tono vascular pulmonar mediante la producción de $InsP_3$ y liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares (Hashimoto y col., 1986; Bakhramov y col., 1996; Yuan y col., 1997a y b). Estos agentes pueden producir vasoconstricción o vasodilatación dependiendo de si activan preferentemente canales de Cl_{Ca} o canales de K_{Ca} (Bakhramov y col., 1996; Clapp y col., 1996; Yuan, 1997a; Salter y Kozlowski, 1998). En este trabajo se muestra que en el árbol arterial pulmonar esta acción depende del tipo de miocitos. En ocasiones la aplicación de noradrenalina dio lugar a un incremento transitorio y rápido de Ca^{2+} de origen intracelular (componente rápido) seguido por una fase sostenida de Ca^{2+} que tiene forma de meseta cuyo origen es extracelular (componente lento). El bloqueo reversible del segundo componente de la señal de Ca^{2+} con la eliminación de Ca^{2+} del medio extracelular, nifedipina y ácido niflúmico (ver Figs. 50 y 51), refleja la participación de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes que se abren como consecuencia de la despolarización que se produce debido a la liberación inicial de

Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y la activación de los canales de Cl_{Ca} . Por lo tanto, el mismo agonista, actuando sobre similares receptores y vías intracelulares, puede producir diferente efecto vasomotor dependiendo del nivel de expresión de los canales de K_{Ca} y Cl_{Ca} en cada miocito. Resultados similares a los nuestros fueron descritos en la contracción de anillos arteriales producida por NA en vena porta (Pacaud y col., 1992) o por fenilefrina en arteria pulmonar (Yuan, 1997a).

Además de las propiedades funcionales que resultan de la expresión diferencial de canales activados por el Ca^{2+} , los miocitos de conducción y de resistencia pulmonares están dotados de otras características específicas que en principio pueden tener un significado funcional muy importante. Desde nuestro punto de vista tiene un interés especial el diferente papel de los receptores intracelulares sensibles a rianodina y a InsP_3 y la regulación de estos por AMPc en miocitos de conducción y de resistencia. Parece por tanto que los miocitos de resistencia están diseñados no sólo para responder con despolarización al aumento de Ca^{2+} intracelular (párrafo anterior) sino que la presencia predominante de RyRs en estos miocitos determina que la entrada de Ca^{2+} o la liberación del ión de reservorios regulados por InsP_3 produzca mayor liberación de Ca^{2+} por estimulación inducida por Ca^{2+} . Sobre este sistema molecular el AMPc ejerce un efecto modulador inhibiendo la contractilidad de los miocitos de conducción y potenciando la de los miocitos de resistencia (Fullerton y col., 1996; Zhao y col., 1998).

Las variables que determinan las diferencias moleculares entre miocitos arteriales pulmonares y la localización topográfica de los distintos tipos de miocitos no son conocidas. Estas podrían relacionarse con la diferente procedencia embriológica de la circulación arterial pulmonar (sexto arco aórtico para las arterias extrapulmonares de conducción y la yema pulmonar para los vasos intrapulmonares) (Hislop y Reid, 1977), pero también podría depender de cambios en la diferenciación celular producidos por factores locales, tales como la baja tensión de O_2 , que regulan la expresión genética (Bunn y Poyton, 1996). El conocimiento de distintos tipos de células en el árbol arterial pulmonar y en otros territorios vasculares pueden también ayudar al desarrollo de agentes terapéuticos más específicos. Por ejemplo, los bloqueantes de los canales de Cl_{Ca} podrían actuar como potentes vasodilatadores

selectivos en arterias intrapulmonares, mientras que tendrían poco efecto en el tono de grandes arterias de conducción.

A modo de resumen final de nuestras observaciones en la figura 52 se expone un esquema explicativo de la función de los diferentes canales, receptores de reservorios de Ca^{2+} y agentes moduladores en los miocitos de conducción y de resistencia. La contractilidad de los miocitos depende directamente de la entrada de calcio por canales de la membrana o de la liberación de calcio de almacenes intracelulares resultante de la presencia de agentes vasoactivos.

Un primer nivel de regulación diferencial de la contractilidad en los miocitos arteriales pulmonares se relaciona con la expresión en éstos de canales activados por Ca^{2+} distintos según su localización longitudinal. En los miocitos de conducción, el incremento de Ca^{2+} intracelular produce preferentemente respuestas contráctiles transitorias debido a que este incremento de Ca^{2+} es pasajero, limitado por los mecanismos de amortiguación del ión, y a que la activación de canales K_{Ca} da lugar a hiperpolarización y cierre de los canales voltaje-dependientes de la membrana. Por el contrario, en los miocitos de resistencia el incremento de Ca^{2+} intracelular produce preferentemente activación de canales de Cl_{Ca} , despolarización y apertura de canales de Ca^{2+} de la membrana, lo que resulta en incrementos mantenidos de la concentración de Ca^{2+} intracelular.

Un segundo nivel de regulación diferencial de la contractilidad en arterias finas depende del cebamiento del sistema de liberación de Ca^{2+} inducida por el Ca^{2+} que se manifiesta con especial entidad funcional en los RyRs presentes en los miocitos de resistencia. Este proceso se pone en marcha bien por el Ca^{2+} liberado tras la activación de InsP_3Rs (CICRi) o por el Ca^{2+} del medio extracelular (CICRe). Sobre este esquema los agentes que regulan la producción de AMPc intracelular representan un tercer nivel de modulación diferencial de la contractilidad de los miocitos pulmonares al tener la posibilidad de potenciar o inhibir el funcionamiento de los RyRs e InsP_3Rs respectivamente.

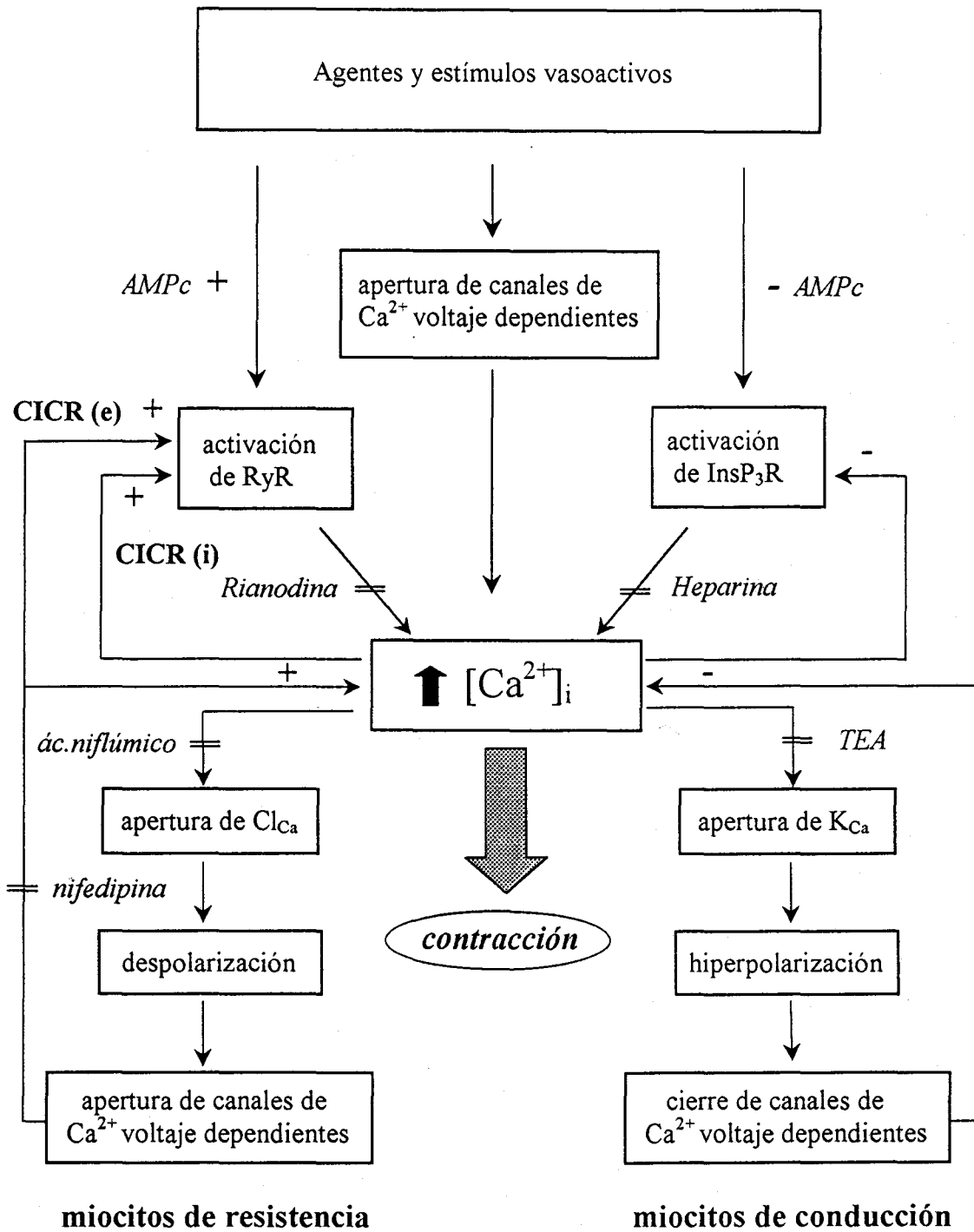


Figura 52. Diagrama representativo del papel desempeñado por los receptores de liberación de Ca^{2+} intracelulares y los canales iónicos sensibles a Ca^{2+} en el control del tono vascular en los miocitos de resistencia y de conducción de la arteria pulmonar (ver texto para más detalle).

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. Mediante técnicas microfluorimétricas se han registrado oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos dispersos de arteria pulmonar de conejo. En algunos casos, estas oscilaciones también se han podido inducir en miocitos silentes con la aplicación extracelular de ATP, cafeína o noradrenalina. El nivel basal de la $[Ca^{2+}]_i$, la amplitud y la frecuencia de las oscilaciones se modifican por los cambios de flujo del ión desde el medio extracelular. Generalmente, las maniobras experimentales que incrementan el flujo de Ca^{2+} hacia el citosol inducen el aumento del nivel basal de Ca^{2+} , la frecuencia de las oscilaciones y disminuyen la amplitud de las espigas. La eliminación de Ca^{2+} del medio extracelular produce el efecto contrario o interrumpe las oscilaciones.

2. Las oscilaciones se originan por la liberación y recaptación de Ca^{2+} por los reservorios intracelulares. Se han identificado receptores sensibles a rianodina y a $InsP_3$. El estudio de las oscilaciones espontáneas mediante el uso de bloqueantes de los receptores para rianodina, $InsP_3$ e inhibidores de la formación de $InsP_3$, han proporcionado diferentes resultados dependiendo de la localización de los miocitos en el árbol arterial pulmonar. Las oscilaciones espontáneas de la $[Ca^{2+}]_i$ en los miocitos de resistencia se originan fundamentalmente por la activación de los receptores para rianodina (mecanismo de liberación de Ca^{2+} mediada por Ca^{2+} , CICR), mientras que

en los miocitos de conducción estas oscilaciones se producen fundamentalmente por la activación de los receptores para InsP_3 (mecanismo de liberación de Ca^{2+} mediado por InsP_3 , IICR).

3. Las oscilaciones inducidas por ATP también se regulan diferencialmente por los inhibidores de los receptores intracelulares del retículo sarcoplásmico y la formación de InsP_3 según la procedencia del miocito. En los miocitos de resistencia, el Ca^{2+} liberado por ATP a través del receptor para InsP_3 parece actuar como cebador y induce las oscilaciones estimulando el receptor para rianodina gracias al mecanismo de CICR. En los miocitos de conducción, el ATP sólo sería capaz de provocar la liberación mediada por la activación del receptor para InsP_3 .

4. El efecto de la cafeína sobre las oscilaciones de Ca^{2+} es similar a los producidos por la teofilina y la forskolina, lo cual sugiere que su acción es sobre la fosfodiesterasa incrementando los niveles de AMPc. En los miocitos de conducción los incrementos de AMPc interrumpen generalmente las oscilaciones. Por el contrario el AMPc apenas afecta, y en algunos casos potencia, las oscilaciones en miocitos de resistencia.

5. El registro simultáneo de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la actividad eléctrica, muestra que los cambios espontáneos o inducidos en los niveles de Ca^{2+} intracelular, inducen la apertura de canales iónicos de K^+ , Cl^- presentes en la membrana plasmática de los miocitos arteriales pulmonares. La caracterización de los canales iónicos activados por Ca^{2+} mediante sustitución iónica y bloqueantes, muestra una distribución diferencial de los canales Cl_{Ca} y K_{Ca} en los miocitos de resistencia y conducción de la arteria pulmonar. En los miocitos de resistencia prevalecen los canales de Cl_{Ca} frente a los canales de K_{Ca} , mientras que en los miocitos de conducción predominan los canales de K_{Ca} sobre los de Cl_{Ca} .

6. La distribución diferencial de los canales regulados por Ca^{2+} determina que un incremento de la concentración de Ca^{2+} citosólico en respuesta a un agente vasoactivo, provoque efectos distintos según la localización longitudinal de los miocitos en el árbol arterial pulmonar. En los miocitos de resistencia la activación de los canales de

Cl_{Ca} , daría lugar a despolarización y apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, lo cual favorecería la vasoconstricción. En los miocitos de conducción la activación de los canales de K_{Ca} produciría hiperpolarización y inhibición de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana, favoreciendo la relajación de los miocitos. La existencia del mecanismo de CICR y el predominio de los canales de Cl_{Ca} en miocitos pulmonares de resistencia (procedentes de la 3ª y 4ª ramas), constituyen dos mecanismos que favorecen la contracción de arterias de pequeño diámetro en respuesta a agentes vasoconstrictores. El predominio de los canales de K_{Ca} en arterias de gran diámetro, favorece la relajación arterial y el flujo sanguíneo a través de éstas.

BIBLIOGRAFIA

Aickin, C.C. (1990). Chloride transport across the sarcolemma of vertebrate smooth and skeletal muscle. In: *Chloride Channels and Carriers in Nerve, Muscle and Glial cells*, ed. Alvarez-Leefmans, F.J., Russel, J.M., Plenum Press, New York. 209-249.

Agustine, G.J., Neher, E. (1992). Calcium requirements for secretion in bovine chromaffine cells. *J. Physiol.* **450**:247-271.

Albarwani, S., Heinert S.G., Turner, J.L., Kozlowski, R.Z. (1995). Differential K⁺ channels distribution in smooth muscle cells isolated from the pulmonary arterial tree of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**:183-189.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994). Energy conversion: Mitochondria and Chloroplasts. In: *Molecular Biology of THE CELL*. 3rd ed. Garland publishing, Inc. 653-720.

Almers, W., Neher, E. (1985). The Ca²⁺ signal from fura-2 loaded mast cells depends strongly on the methods of dye loading. *FEBS Letters.* **192**:13-18.

Amedee, T., Benham, C.D., Bolton, T.B., Byrne, N.G., Large, W.A. (1990). Potassium, chloride and non-selective cation conductances opened by noradrenaline in rabbit ear artery cells. *J. Physiol.* **423**:551-68.

Amenta, F., Bisetti, A., Bronzetti, E., Coppola, L., Felici, L., Ferrante, F., Mariotta, S., Ricci, A. (1998). Density and localization of calcium channels of the L-type in human pulmonary artery. *Clin. Exp. Hypertens.* **20**:389-402.

Archer, S.L., Huang, J.M., Hampl, V., Nelson, D.P., Shultz, P.J., Weir, E.K. (1994). Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:7583-7

- Archer, S.L., Huang, J.M.C., Reeve, H.L., Hampl, V., Tolarová, S., Michelakis, E., Weir, E.K. (1996). Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ. res.* **78**:431-442.
- Arnaudeau, S., Boittin, F.X., Macrez, N., Lavie, J.L., Mironneau, C., Mironneau, J. (1997). L-type and Ca^{2+} release channel-dependent hierarchical Ca^{2+} signalling in rat portal vein myocytes. *Cell Calcium.* **22**:399-411.
- Asada, Y., Yamazawa, T., Hirose, K., Takasaka, T., Iino, M. (1999). Dynamic Ca^{2+} signalling in rat arterial smooth muscle cells under the control of local renin-angiotensin system. *J. Physiol.* **521**:497-505.
- Bae, Y.M., Park, M.K., Lee, S.H., Ho, W.K., Earm, Y.E. (1999). Contribution of Ca^{2+} -activated K^+ channels and non-selective cation channels to membrane potential of pulmonary arterial smooth muscle cells of the rabbit. *J. Physiol.* **514**:747-758.
- Bakhramov, A., Hartley, S.A., Salter, K.J., Kozlowski, R.Z. (1996). Contractile agonists preferentially activate Cl^- over K^+ currents in arterial myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**:168-75.
- Bakhramov, A., Evans, A.M., Kozlowski, R.Z. (1998). Differential effects of hypoxia on the intracellular Ca^{2+} concentration of myocytes isolated from different regions of the rat pulmonary arterial tree. *Exp Physiol.* **83.3**:337-47.
- Barrantes, F.J. (1996). Canales activados por ligando. In: *Biofísica y Fisiología Cellular*. Latorre, R., Barneo, J.L., Bezanilla, F., Llinás, R. *Grafivalme, SL* 336-351.
- Becker, P.L., Fay, F.S. (1987). Photobleaching of fura-2 and its effect on determination of calcium concentrations. *Cell Physiol.* **22**:C613-618.
- Benedeck, G.B., Villars, F.M.H. (1979). Physics with illustrative examples from medicine and biology. In: *Electricity and Magnetism*. Vol. 3. 3(68)-3(76). *Addison wesley*.
- Benham, C.D., Bolton, T.B., Lang, R.J. (1985). Acetylcholine activates an inward current in mammalian smooth muscle cells. *Nature.* **316**:345-347.
- Benham, C.D., Bolton, T.B. (1986). Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J. Physiol.* **381**:385-406.
- Benham, C.D., Hess, P., Tsien, R.W. (1987). Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ. Res.* **61**:10-16.

- Bennie, R.E., Packer, C.S., Powell, D.R., Jin, N., Rhoades, R.A. (1991). Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am. J. Physiol.* **261**:L156-163.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. **361**:315-325.
- Berridge, M.J. (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem. J.* **312**:1-11.
- Berridge, M.J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* **499**:291-306.
- Berridge, M.J., Irvine, R.F. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. **341**:197-205.
- Blatter, L.A., Wier, W.G., (1992). Agonist-induced $[Ca^{2+}]_i$ waves and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in mammalian vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **263**:H576-586.
- Blaustein, M.P. (1993). Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am. J. Physiol.* **264**:C1367-1387.
- Bloom, W., Fawcett, D.W. (1975). Blood and Lymph Vascular Systems. In: *A Text Book of Histology*. W.B. Saunders company. 10th ed. 386-429.
- Boittin, F.X., Coussin, F., Macrez, N., Mironneau, C., Mironneau, J. (1998). Inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channel-dependent Ca^{2+} signalling in rat portal vein myocytes. *Cell Calcium*. **23**:303-11.
- Boittin, F.X., Macrez, N., Halet, G., Mironneau, J., (1999). Norepinephrine-induced Ca^{2+} waves depend on $InsP_3$ and ryanodine receptor activation in vascular myocytes. *Am. J. Physiol.* **277**:C139-151.
- Bootman, M.D., Berridge, M.J. (1995). The elemental principles of calcium signalling. *Cell*. **83**:675-678.
- Brayden, J.E., Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*. **256**:532-535.
- Bunn, H.F., Poyton, R.O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptations to hypoxia. *Physiol. Rev.* **76**:839-885.
- Butcher, R.W., Sutherland, E.W. (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.* **237**:1244-1250.

Byron, K.L., Taylor, C.W. (1993). Spontaneous Ca^{2+} spiking in a vascular smooth muscle cell line is independent of the release of intracellular Ca^{2+} stores. *J. Biol. Chem.* **268**:6945- 6952.

Casteels, R., Kitamura, K., Kuriyama, H., Suzuki, H. (1977). The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol.* **271**:41-61.

Carl, A., Lee, H.K., Sanders, K.M. (1996). Regulation of ion channels in smooth muscles by calcium. *Am. J. Physiol.* **271**:C9-34.

Cauvin, C., Saida, K., van Breemen, C. (1984). Extracellular Ca^{2+} dependence and diltiazem inhibition of contraction in rabbit conduit arteries and mesenteric resistance vessels. *Blood Vessels.* **21**:23-31.

Cheek T. R., O'Sullivan, A.J., Moreton, R.B., Berridge, M.J., Burgoyne, R.D. (1990). The caffeine-sensitive Ca^{2+} store in bovine adrenal chromaffin cells; an examination of its role in triggering secretion and Ca^{2+} homeostasis. *FEBS Lett.* **266**: 1-95.

Cheng, H., Lederer, H.W.J., Cannell, M.B. (1993) Calcium sparks-elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* **262**:740-744.

Clapham, D.E. (1995). Calcium signalling. *Cell.* **80**:259-268.

Clapp, L.H., Turner, J.L., Kozlowaki, R.Z. (1996). Ca^{2+} -activated Cl^- currents in pulmonary arterial myocytes. *Am. J. Physiol.* **270**:H1577-1584.

Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J., Mathie, A. (1998). Characterisation of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* **502**:665-78.

Dawson, S.P., Keizer, J., Pearson, J.E. (1999). Fire-diffuse-fire model of dynamics of intracellular calcium waves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:6060-3.

Désilets, M., Driska, S.P., Baumgarten, C.M. (1989). Current fluctuations and oscillations in smooth muscle cells from hog carotid artery. Role of the sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* **65**:708-22.

Ding, K.H., Husain, S., Akhtar, R.A., Isales, C.M., Abdellatif, A.A. (1997). Inhibition of muscarinic-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} mobilization in cat iris sphincter smooth muscle cells by cAMP-elevating agents. *Cell signal.* **9**:411-421.

Dipolo, R. (1996). Homeostasis intracelular del calcio iónico. In: *Biofísica y Fisiología Celular.* Latorre, R., Barneo, J.L., Bezanilla, F., Llinás, R. *Grafivalme, SL.* 153-175.

- Dolmetsch, R.E., Xu, K., Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. **392**:933-936.
- Drummond, R.M., Tuft, R.A. (1999). Release of Ca^{2+} from sarcoplasmic reticulum increases mitochondrial $[Ca^{2+}]$ in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Physiol*. **516**:139-147.
- Dubayk, G.R., El-Moatassim, C. (1993). Signal transduction via P_2 -purinergic receptors for extracellular ATP and others nucleotides. *Am. J. Physiol*. **265**:C577-606.
- Duchen, M.R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J. Physiol*. **516**:1-17.
- Ehrlich B.E., Watras J. (1988). Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature*. **336**:583-586.
- Ehrlich, B.E., Kaftan, E.D., Bezprozvannaya, S. y Bezprozvanny, I. (1994). The pharmacology of intracellular Ca^{2+} -release channels. *TIPS*. **15**:145-149.
- Endo. M. (1977). Calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev*. **57**:71-108.
- Ertel, S.I. y Erter, E.A. (1997). Low voltage-activated T-type Ca^{2+} channels. *TIPS*. **18**:37-42.
- Farrugia, G. (1999). Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of cajal. *Annu. Rev. Physiol*. **61**:45-84.
- Fleischer, S., Ogunbunmi, E.M., Dixon, M.C., Fleer, A.M. (1985). Localization of Ca^{2+} release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**:7256-7259.
- Foehring, R.C., Lorenzon, N.M. (1999). Neuromodulation, development and synaptic plasticity. *Can. J. Exp. Psychol*. **53**:45-61.
- Franco-Obregón, A., Ureña, J., López-Barneo, J. (1995). Oxygen-sensitive calcium channels in vascular smooth muscle cells and their possible role in hypoxic arterial relaxation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**:4715-4719.
- Franco-Obregón, A., López-Barneo, J. (1996). Differential oxygen sensitivity of calcium channels in rabbit smooth muscle cells of conduit and resistance pulmonary arteries. *J. Physiol*. **491**:511-518.
- Frid, M.G., Moiseeva, E.P., Stenmark, K.R. (1994). Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circ res*. **75**:669-681.

- Fullerton, D.A., Agrafojo, J., Mc Intyre, R.C.Jr. (1996). Pulmonary vascular smooth muscle relaxation by cAMP-mediated pathways. *J. Surg. Res.* **61**:444-8.
- Galione, A. (1993). Cyclic-ADP-ribose: a new way to control calcium. *Science*. **259**:325-326
- Ganitkevich, V.Ya., Isenberg, G. (1995). Efficacy of peak Ca^{2+} current (I_{Ca}) as trigger of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in myocytes from the guinea-pig coronary artery. *J. Physiol.* **484**:287-306.
- Gibson, A., McFadzean, I., Wallace, P., Wayman, C.P. (1998). Capacitative Ca^{2+} entry and the regulation of smooth muscle tone. *TIPS*. **19**:266-269.
- Girad, S., Clapham, D. (1993). Acceleration of intracellular calcium waves in *Xenopus* Oocytes by calcium influx. *Science*. **260**:229-232.
- Gollasch, M., Hescheler, J., Quale, J.M., Patlak, J.B., Nelson, M.T. (1992). Single calcium channel currents of arterial smooth made at physiological calcium concentrations. *Am. J. Physiol.* **263**:2948-52.
- Grégoire, G., Loirand, G., Pacaud, P. (1993). Ca^{2+} and Sr^{2+} entry induced Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store in smooth muscle cells of rat portal vein. *J. Physiol.* **474**:483-500
- Grynkiewicz, C., Poenie, M., Tsein, R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**:3440-3450.
- Guerrero, A., Fay, F.S., Singer, J.J. (1994). Caffeine activated a Ca^{2+} -permeable, nonselective cation channels in smooth muscle cells. *J. Gen. Physiol.* **104**:375-394.
- Guibert, C., Pacaud, P., Loirand, G., Marthan, R., Savineau, J.P. (1996a). Effect of extracellular ATP on cytosolic Ca^{2+} concentration in rat pulmonary artery myocyte. *Am. J. Physiol.* **271**:450-8.
- Guibert, C., Marthan, R., Savineau, J.P. (1996b). Angiotensin II- induced Ca^{2+} -oscillations in vascular myocytes from the rat pulmonary artery. *Am. J. Physiol.* **270**:637-42.
- Gunter, T.E., Gunter, K.K., (1994). Transport of calcium by mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 471-485.
- Hamada, H., Damron, D.S., Hong, S.J., Van Wagoner, D.R., Murray, P.A. (1997). Phenylephrine-induced Ca^{2+} oscillations in canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* **81**:812-23.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. Sighworth, F.J. (1981). Improved

patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv*. **391**:85-100.

Hartley, S.A., Kozłowski, R.Z. (1997). Electrophysiological consequences of purinergic receptor stimulation in isolated rat pulmonary arterial myocytes. *Circ. Res.* **80**:170-8.

Hashimoto, T., Hirata, M., Itoh, T., Kanmura, Y., Kuriyama, H. (1986). Inositol 1,4,5-triphosphate activates pharmacomechanical coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *J. Physiol.* **370**:605-618.

Henmi, S., Imaizumi, Y., Muraki, K., Watanabe, M. (1996). Time course of Ca^{2+} -dependent K^+ and Cl^- currents in single smooth muscle cells of guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* **306**:227-36.

Hicks, G.A., Marrion, N.V. (1998). Ca^{2+} -dependent inactivation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channels in rat hippocampal neurones produced by pore block from an associated particle. *J. Physiol.* **508**:721-34.

Highsmith, S., Bloebaum, P., Snodowne, K.W. (1986). Sarcoplasmic reticulum interacts with the Ca^{2+} indicator precursor fura-2AM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**:1153-62.

Himpens, B., Missiaen, L., Casteels, R. (1995). Ca^{2+} homeostasis in vascular smooth muscle. *J. Vasc. Res.* **32**:207-19.

Hislop, A., Reid, L.M. (1977). Formation of the pulmonary vasculature. In : *hodson WA, ed. Development of the Lung*. New York, NY:Marcel Dekker Inc. 37-86.

Hogg, R.C., Wang, Q., Large, W.A. (1993a). Time course of spontaneous calcium-activated chloride currents in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J. Physiol.* **464**:15-31.

Hogg, R.C., Wang, Q., Helliwell, R.M., Large, W.A. (1993b). Properties of spontaneous inward currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *Pflügers Arch.* **425**:233-240.

Hogg, R.C., Wang, Q., Large, W.A. (1994). Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br. J. Pharmacol.* **112**:977-984.

Huang, Y., Lau, C.W., Chan, F.L., Yao, X.Q. (1999). Contribution of nitric oxide and K^+ channel activation to vasorelaxation of isolated rat aorta induced by procaine. *Eur. J. Pharmacol.* **367**:231-7.

Hughes, A.D. (1998). Contractile mechanisms of vascular smooth muscle. In: *An*

introduction to Vascular Biology. From physiology to pathophysiology. Halliday, A., Hunt, B.J., Poston, L., Schachter, M. *Cambridge university press*. 50-70.

Hyvelin, J.M., Guibert, C., Marthan, R., Savineau, J.P. (1988). Cellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocyte. *Am. J. Physiol.* **275**:L269-82.

Iino, M., Kobayashi, T., Endo, M. (1988). Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**:417-22.

Iino, M. (1990). Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.* **95**:1103-1122.

Iino, M., Yamazawa, T., Miyashita, Y., Endo, M., Kasai, H. (1993). Critical intracellular Ca^{2+} concentration for all-or-none Ca^{2+} spiking in single smooth muscle cells. *EMBO J.* **12**:5287-91.

Iino, M., Kasai, H., Yamazawa, T. (1994). Visualization of neural control of intracellular Ca^{2+} concentration in single vascular smooth muscle cells. *EMBO J.* **13**:5026-5031.

Islam, M.S., Leibiger, I., Leibiger, B., Rossi, D., Sorretino, V., Ekstrom, T.J., Westerblad, H., Andrade, F.H., Berggren, P.O. (1998). In situ activation of the type 2 ryanodine receptor in pancreatic β -cells requires cAMP-dependent phosphorylation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **95**:6145-6150.

Jaggard, J.H., Wellman, G.C., Heppner, T.J., Porter, V.A., Perez, G.J., Gollasch, M., Kleppisch, T., Rubart, M., Stevenson, A.S., Lederer, W.J., Knot, H.J., Bonev, A.D., Nelson, M.T. (1998). Ca^{2+} channels, ryanodine receptors and Ca^{2+} -activated K^+ channels: a functional unit for regulating arterial tone. *Acta. Physiol. Scand.* **164**:577-87

Janssen, L.J., Sims, S.M. (1992). Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J. Physiol.* **453**:197-218

Johansson, B., Somlyo, A.P., Bethesda, M.D. (1980). Electrophysiology and excitation-contraction coupling. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Vascular Smooth Muscle*. *Am Physiol Soc.* sect. 2, vol II:301-323.

Jouaville, L.S., Ichas, F., Holmuhamedov, E.L., Camacho, P., Lechleiter, J.D. (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* **377**:438-441.

Kamishima, T., McCarron, J.G. (1997). Regulation of the cytosolic Ca^{2+} concentration

- by Ca^{2+} stores in single smooth muscle cells from rat cerebral arteries. *J. Physiol.* **501**:497-508.
- Kappl, M., Hartung, K. (1996). Rapid charge translocation by the cardiac Na^+ - Ca^{2+} exchanger after a Ca^{2+} concentration jumps. *Biophys. J.* **71**:2473-85.
- Kawanishi, T., Blank, L.M., Harootunian, A.T., Smith, M.T., Tsien, R.Y. (1989). Ca^{2+} oscillations induced by hormonal stimulation of individual fura-2-loaded hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **264**:12859-66.
- Kawanishi, T., Kawanishi, M., Ohata, H., Yoyoda, K., Takahashi, M., Momose, K., Hayashi, Y. (1994). The relationship between spontaneous calcium oscillations and cell proliferation in cultured smooth muscle cells. *Jpn. J. Pharmacol.* **65**:59-62.
- Kim, S.J., Koh, E-M., Kang, T.M., Kim, Y.C., So, I., Isenberg, G., Kim, K.W. (1998). Ca^{2+} influx through carbachol-activated non-selective cation channels in guinea-pig gastric myocytes. *J. Physiol.* **513**:749-760.
- Kobayashi, S., Somlyo, A.V., Somlyo, A.P. (1988). Heparin inhibits the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent, but not the independent, calcium release induced by guanine nucleotide in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**:625-31.
- Kolbeck, R.C., Speir, W.A.Jr. (1987). Regional contractile responses in pulmonary artery to alpha- and beta-adrenoceptor agonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**:1165-70.
- Kuemmerle, J.F., Murthy K.S., Makhlof, G.M. (1994). Agonist-activated, ryanodine-sensitive, IP_3 -insensitive Ca^{2+} release channels in longitudinal muscle of intestine. *Am. J. Physiol.* **266**:C1421-31.
- Large, W.A., Wang, Q. (1996). Characteristics and physiological role of the Ca^{2+} -activated Cl^- conductance in smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **271**:C435-54
- Leblanc, N., Leung, P.M. (1995). Indirect stimulation of Ca^{2+} activated Cl^- current by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in rabbit portal vein smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **268**:H1906-1917
- Lee, H.C. (1993). Potentiation of calcium-induced and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* **268**:293-299.
- Lee, S.H., Earm, Y.E. (1994). Caffeine induces periodic oscillations of Ca^{2+} -activated K^+ current in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* **426**:189-198.
- Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G., Tsien, R.Y. (1998). Cell-permeant caged InsP_3 ester shows that Ca^{2+} spike frequency can optimize gene expression. *Nature.* **392**:936-941.

- Lipp, P., Niggli, E. (1996). Submicroscopic calcium signals as fundamental event of excitation-contraction coupling in guinea-pig cardiac myocytes. *J. Physiol.* **492**:31-38.
- Loirand, G., Pacaud, P., Baron, A., Mironneau, C.Y., Mironneau, J. (1991). Large conductance calcium-activated non-selective cation channel in smooth muscle cells isolated from rat portal vein. *J. Physiol.* **437**:461-475.
- López-López J.R., Shacklock, P.S., Balke, C.W., Wier, W.G. (1995). Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science*. **268**:1042-1045.
- Macrez-Lepretre, N., Mironneau, J. (1999). InsP₃ and ryanodine receptor-mediated elementary Ca²⁺ signalling in smooth muscle cells. *J. Physiol.* **512P**:3S (Abstr.)
- McCarron, J.G, Muir, T.C. (1999). Mitochondrial regulation of the cytosolic Ca²⁺ concentration and the InsP₃-sensitive Ca²⁺ store in guinea-pig colonic smooth muscle. *J. Physiol.* **516**:149-161.
- McDonald, T.F. Pelzer, S., Trautwein, W., Pelzer, D.J. (1994). Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* **74**:365-507.
- Miriél, V.A., Mauban, J.R.H., Blaustein, M.P., Weir, W.G. (1999). Local and cellular Ca²⁺ transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *J. Physiol.* **518**:815-824.
- Mironneau, J., Macrez-Lepretre, N. (1995). Modulation of Ca²⁺ channels by alpha 1A- and alpha 2A-adrenoceptors in vascular myocytes: involvement of different transduction pathways. *Cell Signal.* **7**:471-9.
- Mironneau, J., Arnaudeau, S., Macrez-Lepretre, N., Boittin, F.X. (1996). Ca²⁺ sparks and Ca²⁺ waves activate different Ca²⁺-dependent ion channels in single myocytes from rat portal vein. *Cell Calcium.* **20**:53-160.
- Missiaen, L., Taylor, C.W., Berridge, M.J. (1991). Spontaneous calcium release from inositol trisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature.* **352**:241-4.
- Morita, H., Cousins, H., Onoue, H., Ito, Y., Inoue, R. (1999). Predominant distribution of nifedipine-insensitive, high voltage-activated Ca²⁺ channels in the terminal mesenteric artery of guinea pig. *Circ. Res.* **85**:596-605.
- Mulvany, M.J. (1988). Possible role of vascular oscillatory activity in the development of high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12**:S16-20.
- Murthy, K.S., Zhang, K.M., Jin, J.G., Grider, J.R., Makhlof, G.M. (1993). VIP-

- mediated G protein-coupled Ca^{2+} influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am. J. Physiol.* **265**:G660-71.
- Muñoz, A., Garcia, L., Guerrero-Hernandez, A. (1998). In situ characterization of the Ca^{2+} sensitivity of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: implications for their use as near-membrane Ca^{2+} indicators in smooth muscle cells. *Biophys. J.* **75**:1774-82.
- Nelson, M.T., Patlak, J.B., Worley, J.F., Standen, N.B. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.* **259**:C3-C18.
- Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D. Knot, H. J., Lederer, W.J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science.* **270**:633-637.
- Nelson, M.T., Conway, M.A., Knot, H.J., Brayde J.E. (1997). Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J. Physiol.* **502**:259-264.
- Neylon, C.B., Avdonin, P.V., Dilley, R.J., Larsen, M.A., Tkachuk, V.A., Bobik, A. (1994). Different electrical responses to vasoactive agonists in morphologically distinct smooth muscle cell types. *Circ. Res.* **75**:733-41.
- Oakes, S.G., Martin, W.J., Lisek, A., Powis, G. (1988). Incomplete hydrolysis of the calcium indicator precursor fura-2 penta-acetoxymethyl ester (fura 2-AM) by cells. *Anal. Biochem.* **169**:159-166.
- Ortega-Sàenz, G.P. (1998). Determinantes moleculares de la interacción de los canales de potasio con los cationes extracelulares. *Tesis Doctoral.*
- Ousterhout, J.M., Sperelakis, N. (1987). Effect of Bay K 8644 on tetraethylammonium-induced excitability of the rabbit pulmonary artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **65**: 828-33.
- Pacaud, P., Bolton, T.B. (1991). Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells. *J. Physiol.* **441**:477-99.
- Pacaud, P., Loirand, G., Bolton, T.B., Mironneau, C., Mironneau, J. (1992). Intracellular cations modulate noradrenaline-stimulated calcium entry into smooth muscle cells of rat portal vein. *J. Physiol.* **456**:541-556.
- Parker, I., Ivorra, I. (1990) Inhibition by Ca^{2+} of inositol trisphosphate-mediated Ca^{2+} liberation: a possible mechanism for oscillatory release of Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:260-4.
- Parker, I., Ivorra, I. (1991). Caffeine inhibits inositol triphosphate-mediated liberation

- of intracellular calcium in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **433**:299-240.
- Pauletto, P., Sartore, S., Giuriato, L., Scatena, M., Guidolin, D., Scannapieco, G., Pessina, A.C. (1991). Computer-driven assessment of 'immature'-type smooth muscle cells in rabbit aorta. *J. Hypertens. Suppl.* **9**:S180-1.
- Poenie, M. (1990). Alteration of intracellular fura-2 fluorescence by viscosity. A simple correction. *Cell calcium.* **11**:85-91.
- Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. (1992). Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* **262**:C882-90.
- Post, J.M., Gelband, C.H., Hume, J.R. (1995). $[Ca^{2+}]_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. Novel mechanism for hypoxia-induced membrane depolarization. *Circ. Res.* **77**:131-9.
- Prakash, Y.S., Kannan, M.S., Sieck, G.C. (1997). Regulation of intracellular oscillations in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **272**:C966-975.
- Pusch, M., Jordt, S.E., Stein, V., Jentsch, T.J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J. Physiol.* **515**:341-53.
- Putney, J.W. (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* **11**:611-624.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., Tullio P. (1998). Close contacts with endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science.* **280**:1763-1766.
- Rousseau, E., Smith, J.S. & Meissner, G. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior on single Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol.* **253**:C364-368.
- Rousseau, E., Ladine, J., Liu, Q.Y., Meissner, G. (1988). Activation of Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophysic.* **267**:75-86.
- Sabouni, M.H., Mustafá S.J. (1989). Effects of adenosine analogs and ouabain on rhythmicity in human coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* **168**:271-276.
- Sagara, Y., Inesi, G. (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J. Biol. Chem.* **266**:13503-6.
- Salter, K.J., Turner, J.L., Albarwani, S., Clapp, L.H., Kozlowski, R.Z. (1995). Ca^{2+} -activated Cl^- and K^+ channels and their modulation by endothelin-1 in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Exp. Physiol.* **80**:815-24.
- Salter, K.J., Kozlowski, R.Z. (1998). Differential electrophysiological actions of

- endothelin-1 on Cl^- and K^+ currents in myocytes isolated from aorta, basilar and pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**:1122-31.
- Scanlon, M., Williams, D.A., Fay, F.S. (1987). A Ca^{2+} -insensitive form of fura-2 associated with polymorphonuclear leukocytes. Assessment and accurate Ca^{2+} measurement. *J. Biol. Chem.* **262**:6308-12.
- Shin, W.S., Toyo-Oka, T., Masuo, M., Okai, Y., Fujita, H., Sugimoto, T. (1991). Subpopulations of rat vascular smooth muscle cells as discriminated by calcium release mechanisms from internal stores. *Circ. Res.* **69**:551-556.
- Singer, J.J., Walsh, J.V.Jr. (1986). Large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in freshly dissociated smooth muscle cells. *Membr. Biochem.* **6**:83-110.
- Smith, R.J., Sam, L.M., Justen, J.M., Bundy, G.L., Bala, G.A., Bleasdale, J.E. (1990). Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Experim. Therapeutics.* **253**:688-697.
- Smith, J.B. (1996). Calcium homeostasis in smooth muscle cells. *New. Horiz.* **4**:2-18.
- Somlyo, A.P., Somlyo A.V. (1994). Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* **372**:231-236.
- Supattapone, S., Worley, P.F., Barbaran, J.M., Snyder, S.H. (1988). Solubilization, purification, and characterization of an inositol triphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* **263**:1530-1534.
- Sun, X.P., Supplisson, S., Torres, R., Sachs, G., Mayer, E. (1992). Characterization of large-conductance chloride channels in rabbit colonic smooth muscle. *J. Physiol.* **448**: 355-82.
- Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:2466-70.
- Thirstrup, S., Nielsen-Kudsk, J.E., Mellekjær, S. (1997). Involvement of K^+ channels in the relaxant effect of vasoactive intestinal peptide and atrial natriuretic peptide in isolated guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* **319**:253-9.
- Thorn, P. (1995). Ca^{2+} influx during agonist and $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ -evoked Ca^{2+} oscillations in HeLa epithelial cells. *J. Physiol.* **482**:275-281.
- Tribe, R.M., Borin, M.L., Blaustein, P. (1994). Functionally and spatially distinct Ca^{2+} stores are revealed in cultured vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 91:5908-5912.

Ugur, M., Drummond, R.M., Zou, H., Sheng, P., Singer, J.J., Walsh, J.V. Jr. (1997). An ATP-gated cation channel with some P2z-like characteristics in gastric smooth muscle cells of toad. *J. Physiol.* 498:427-42.

Uneyama, H., Uneyama, C., Akaike, N. (1993). Intracellular mechanisms of cytoplasmic Ca^{2+} oscillation in rat megakaryocyte. *J. Biol. Chem.* 268:168-74

Ureña, J., Franco-Obregón, A., López-Barneo, J. (1996). Contrasting effects of hypoxia on cytosolic Ca^{2+} spikes in conduit and resistance myocytes of the rabbit pulmonary artery. *J. Physiol.* 496:103-109.

Usachev, Y., Kostyuk, P., Verkhratsky, A. (1995). 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) affects potassium permeability in rat sensory neurones via pathways that are sensitive and insensitive to $[Ca^{2+}]_i$. *Pflugers Arch.* 430:420-8.

Vadula, M.S., Kleinman, J.G., Madden, J.A. (1993). Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca^{2+} in pulmonary and cerebral arterial myocytes. *Am. J. Physiol.* 265:L591-7.

Van Breemen, C., Saida, K. (1989). Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 51:315-329.

Wadsworth, R.M., (1994). Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia. *Trends Pharmacol. Sci.* 15:47-53.

Walker, B.R. (1995). Evidence for uneven distribution of L-type calcium channels in rat pulmonary circulation. *Am. J. Physiol.* 38:H2051-2056.

Wang, Q., Large, W.A. (1993). Action of histamine on single smooth muscle cells dispersed from the rabbit pulmonary artery. *J. Physiol.* 468:125-139.

Wier, W.G., Blatter, L.A. (1991). Ca^{2+} -oscillations and Ca^{2+} -waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell calcium.* 12:241-54.

Weir, E.K., Archer, S.L. (1995). The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J.* 9:183-189.

Wong, A.Y., Klassen, G.A. (1993). A model of calcium regulation in smooth muscle cell. *Cell Calcium.* 14:227-43.

Wu, S.N., Yu, H.S., Seyama, Y. (1996). Analytical studies of spontaneous and vasopressin-induced calcium oscillations in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Biochem. Tokyo.* 119:42-8

- Yammamoto, N. (1991). Caffeine sensitive and insensitive intracellular calcium stores in vascular smooth muscle cells of the guinea-pig. *J. Vasc. Med. Biol.* **3**:154-160
- Yamazaki, J., Duan, D., Janiak, R., Kuenzli, K., Horowitz, B., Hume, J.R. (1998). Functional and molecular expression of volume-regulated chloride channels in canine vascular smooth muscle cells. *J. Physiol.* **507**:729-736.
- Yao, Y., Choi, J., Parker, I. (1995). Quantal puffs of intracellular Ca^{2+} evoked by inositol triphosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **482**:533-553.
- Yoshida, A., Ogura, A., Imagawa, T., Shigekawa, M., Takahashi, M. (1993). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the rat brain ryanodine receptor. *J. Neurosci.* **12**:1094-1100.
- Yuan, X.J., Goldman, W.F., Tod M.L., Rubin, L.J., Blaustein, M.P. (1993). Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am. J. Physiol.* **264**:L116-23.
- Yuan, X.J., Tod, M.L., Rubin, L.J., Blaustein, M.P. (1996). NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca^{2+} concentration by activating voltage-gated K^+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:10489-94.
- Yuan, X.J. (1997a). Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone. *Am. J. Physiol.* **272**:L959-L968.
- Yuan, X.J., Bright, R.T., Aldinger, A.M., Rubin, L.J. (1997b). Nitric oxide inhibits serotonin-induced calcium release in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **272**:L44-50.
- Zhao, Y.J., Wang, J., Rubin, L.J., Yuan, X.J. (1998). Roles of K^+ and Cl^- channels in cAMP-induced pulmonary vasodilation. *Exp. Lung. Res.* **41**:71-83.
- Zholos, A.V., Komori, S., Ohashi, H., Bolton, T.B. (1994). Ca^{2+} inhibition of inositol triphosphate-induced Ca^{2+} release in single smooth muscle cell in guinea-pig small-intestine. *J. Physiol.* **481**:97-109.
- ZhuGe, R., Sims, S.M., Tuft, R.A., Fogarty, K.E., Walsh, J.V.Jr. (1998). Ca^{2+} sparks activate K^+ and Cl^- channels, resulting in spontaneous transient currents in guinea-pig tracheal myocytes. *J. Physiol.* **513**:711-8.

ABREVIATURAS

AMPc	adenosin monofosfato cíclico
ATP	adenosin trifosfato
CCCP	carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
Cl _{Ca}	canales de cloro activado por calcio
EGTA	ethylen glycol-bis“β-aminoethyl ether” N,N,N',N'-tetraacetic acid
E _{Cl}	potencial de equilibrio de cloro
E _K	potencial de equilibrio de potasio
E _{rev}	potencial de reversión
InsP ₃	Inositol 1,4,5, trifosfato
InsP ₃ R	receptor para InsP ₃
K _{Ca}	canales de potasio activado por calcio
RyR	receptor para rianodina
STIC y STOC	corriente espontánea transitoria entrante y saliente
TEA	tetraetilamonio
IBMX	3-isobutyl-1-methyxanthine
NA	noradrenalina
V _h	holding potential
V _m	potencial de membrana
4 AP	4 amino piridina

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. TARIK STANI
titulada HONESTIDAD DEL ENFERMO EN TERCEROS DEL
DIRIGIR DIRIGIR PUNTO

por la que se le confiere el grado de SOBRESALIENTE EN LAURE
POR UNANIMIDAD

Sevilla, 24 de Julio 2000

El Vicerrector
Luis Tabares

El Decano
Pablo

El Doctorado
[Signature]

El Director de la Tesis
[Signature]

El Examinador
[Signature]

[Signature]